

**SYTOKIINITUOTANNON KÄYNNISTYMINEN
TOLL-LIKE-RESEPTORIEN STIMULAATIOSSA JA
MENETELMÄN SOVELLUKSET
YMPÄRISTÖTERVEYSTUTKIMUKSESSA**

Jukka Hirvonen

Pro gradu -tutkielma

Proviisorin koulutusohjelma

Itä-Suomen yliopisto

Farmasian laitos/Lääkeainetoksikologia

Maaliskuu 2010

Avainsanat: Toll-like-reseptori, sytokiini, stimulaatio, PBMC-solut, immunitetti

Ihmisen immuunijärjestelmä koostuu synnynnäisestä ja hankitusta immunitetista, joiden osatekijät toimivat tiiviissä yhteistyössä elimistön puolustautuessa taudinaiheuttajia vastaan. Sytokiinit ovat immuunijärjestelmää ohjaavia ja sen toimintoja sääteleviä valkuaisaineita, jotka toimivat sekä synnynnäisen että hankitun immunitetin solujen välisinä viestimolekyyleinä kontrolloiden muun muassa tulehdusreaktiota.

Toll-like-reseptorit ovat patogeeneille tyypillisiä rakenteita tunnistavia solukalvo- ja endosomireseptoreita, joiden aktivoituminen saa solun tuottamaan sytokiineja. Toll-like-reseptorien oikeanlainen toiminta on edellytys sille, että immuunijärjestelmä reagoi tarkoituksenmukaisesti elimistöön pyrkivää taudinaiheuttajaa vastaan. Ihmiseltä on löydetty kymmenen eri Toll-like-reseptorialatyyppeä, joilla kullakin on omat spesifiset ligandinsa ja osittain päällekkäiset solunsisäiset signaalointimekanisminsa. Toll-like-reseptoreita on kaikissa immuunijärjestelmän soluissa, ja niitä on tutkittu paljon niin kvalitatiivisesti, kvantitatiivisesti kuin funktionaalisestikin. Käytetyimpiä tutkimuksissa hyödynnettyjä menetelmiä ovat olleet virtausytometria ja RT-PCR.

Solujen sytokiinituotantoa on mahdollista mitata useilla eri menetelmillä. Yleisimpiä ovat ELISA ja RT-PCR sekä uudemmat multiplex-menetelmät, joilla pystytään mittaamaan usean eri sytokiinin määrä yhdestä näytteestä samanaikaisesti. Monen tekijän on todettu vaikuttavan solujen sytokiinivasteisiin, mikä hankaloittaa tutkimustulosten välistä vertailua. Tällaisia tekijöitä ovat muun muassa näytteiden käsittely ja säilytys, vuodenaika sekä koehenkilöiden ikä ja sukupuoli.

Toll-like-reseptoreiden yhteyttä erilaisten kroonisten sairauksien etiologiaan on tutkittu paljon ja joitakin viitteitä niiden osuudesta asiaan on jo saatu. Esimerkiksi astmatikoilla Toll-like-reseptorit toimivat vajavaisesti, mikä johtaa heikentyneeseen immuunivasteeseen. Myös muissa kroonisissa sairauksissa on havaittu muutoksia Toll-like-reseptorien ilmentymisessä ja toiminnassa, mutta täyttä selvyyttä niiden yhteydestä sairauksien syntyyn ei ole vielä saatu.

Tämän opinnäytetyön kokeellisessa osassa selvitettiin pakastamisen vaikutuksia kahdeksalla eri Toll-like-reseptoriligandilla stimuloitujen PBMC-solujen seitsemän eri sytokiinin tuotantoon. Mittaukset tehtiin MSD[®]:n elektrokemiluminesenssiin perustuvalla sytokiinimittauslaitteistolla supernatantista. Pakastamisen todettiin vähentävän erityisesti *Streptomyces californicus* -bakteerin itiöillä stimuloitujen solujen IFN- γ :n, IL-10:n, IL-12p70:n ja IL-6:n tuotantoa, kun taas lipopolysakkaridilla ja Pam₃CSK₄-lipopeptidillä stimuloitujen solujen IL-1 β :n ja TNF- α :n tuotanto lisääntyi.

UNIVERSITY OF EASTERN FINLAND, Faculty of Health Sciences
Master of Science in Pharmacy Program

Medicinal toxicology

HIRVONEN JUKKA, S.: Measuring cytokine production after stimulation of human white blood cells using Toll-like receptor ligands, and applications in environmental research.

Master's thesis, 67 p., 1 appendix (12 p.)

Supervisors: Professor Maija-Riitta Hirvonen, Marjut Roponen (PhD (Pharm.)), Kati Huttunen (PhD)

March 2010

Keywords: Toll-like receptor, cytokine, stimulation, PBMC, immunity

The components of innate and acquired immunity constitute the human immune system fighting against disease causing agents. Cytokines are proteins that mediate the functions of different cells of innate and acquired immunity, controlling e.g. inflammation.

Toll-like receptors recognize pathogen-associated molecular patterns on cell surfaces and inside cells initiating the production of cytokines on activation. Proper function of Toll-like receptors is a prerequisite for an adequate immune response to a foreign antigen. Ten different Toll-like receptors have been discovered in the human body, all of which have specific ligands and partially overlapping signalling pathways. All types of immune cells express Toll-like receptors, which have been a target of interest in both qualitative and quantitative as well as functional research. The most frequently used methods so far to study Toll-like receptors have been flow cytometry and RT-PCR.

Cytokine production of cells can be measured using several methods, the most common of which are ELISA and RT-PCR along with more recent multiplexing methods capable of measuring several cytokines in a single sample simultaneously. Studies have shown that there are a number of factors affecting the outcome of cytokine measurements. Those factors include handling and storage of samples, seasonal variation and age and gender of test subjects.

The connections between Toll-like receptors and various chronic diseases have been under vigorous study recently, resulting in some leads as to establishing cause-effect relationships. E.g. asthmatics have impaired function of Toll-like receptors causing a diminished immune response. Also several other chronic illnesses have been found to exhibit changes in Toll-like receptor expression and function. The exact role of these receptors remains, though, still somewhat unclear.

The experimental part of this Master's thesis studied the effects of freezing on cellular cytokine production. We used eight different Toll-like receptor ligands to stimulate fresh and frozen peripheral blood mononuclear cells and measured the levels of seven different cytokines. Cytokine measurements were performed on the collected supernatant using MSD[®] electrochemiluminescence-based assay. Freezing was found to decrease mostly the production of IFN- γ , IL-10, IL-12p70 and IL-6 in samples stimulated with spores of *Streptomyces californicus*, whereas the production of IL-1 β and TNF- α was increased in samples stimulated with lipopolysaccharide and Pam₃CSK₄ lipopeptide.

ESIPUHE

Tämä opinnäytetyö on tehty Terveiden ja Hyvinvoinnin Laitoksella. Suuret kiitokset tämän haastavaa aihealuetta käsittelevän työn toteuttamisen mahdollistamisesta ja asiantuntevasta ohjauksesta kuuluvat ohjaajilleni Marjut Roposelle ja Kati Huttuselle sekä Maija-Riitta Hirvoselle.

Kiitokset myös vaimolleni Susannalle, jonka tuki koko graduprosessin aikana oli korvaamattoman arvokasta.

Kuopiossa maaliskuussa 2010

Jukka Hirvonen

SISÄLTÖ

I KIRJALLISUUSOSA

1	JOHDANTO	6
2	YLEISTÄ IMMUUNIJÄRJESTELMÄSTÄ	7
	2.1. Synnynnäinen immunitetti	7
	2.2. Hankittu immunitetti	9
3	SYTOKIINIT	10
	3.1. Yleistä sytokiineistä ja niiden tehtävistä immuunijärjestelmässä	10
	3.2. Tärkeimmät synnynnäisen immunitetin sytokiinit	12
	3.3. Tärkeimmät hankitun immunitetin sytokiinit	14
	3.4. Hematopoeettiset sytokiinit	14
	3.5. Sytokiiniinien mittaamenetelmät	15
	3.5.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	15
	3.5.2. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	15
	3.5.3. Multiplex-menetelmät	16
	3.5.4. Muut mittaamenetelmät	17
	3.6. Sytokiiniääritysten luotettavuuteen vaikuttavat tekijät	18
4	TOLL-LIKE-RESEPTORIT	20
	4.1. Yleistä	21
	4.2. Rakenne ja signaalintimekanismi	22
	4.3. Ligandit	24
	4.4. Merkitys immuunivasteiden kehityksessä	26
	4.5. TLR:ien tutkimusmenetelmät	30
5	VASTEISIIN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ	31
6	TLR-TUTKIMUSMENETELMIEN SOVELLUKSIA TERVEYSTUTKIMUKSESSA	33
	6.1. Astma ja allergia	33
	6.2. Muut krooniset sairaudet	34

II KOKEELLINEN OSA

7	TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET	36
8	TUTKIMUSAINESTO JA MENETELMÄT	37
	8.1. Verinäytteet	37
	8.2. PBMC-solujen eristys	37
	8.3. PBMC-solujen stimulointi TLR-ligandeilla	37
	8.4. Sytokiiniinien mittaaminen MSD-laitteistolla	39
	8.5. Aineiston analysointi	41
9	TULOKSET	41
10	POHDINTA	46
11	YHTEENVETO	48
12	KIRJALLISUUS	49

LIITETAULUKKO

I KIRJALLISUUSOSA

1 JOHDANTO

Ihmisen immuunijärjestelmän tasapainoinen toiminta on edellytys sille, että elimistö reagoi taudinaiheuttajiin juuri sopivalla tehokkuudella. Jos immuunijärjestelmän reaktiot jäävät riittämättömiksi, näennäisen vaarattomatkin patogeenit voivat aiheuttaa suurta tuhoa elimistössä. Tämä on suuri ongelma immuunipuutoksesta kärsiville ihmisille, kuten AIDS-potilaille. Immuunijärjestelmä voi toimia myös liian tehokkaasti ja epätarkoituksenmukaisesti hyökäten elimistön omia kudoksia vastaan ja aiheuttaen kroonisia tulehdustiloja, joista yleisimpiin kuuluvat astma ja nivelreuma.

Toll-like-reseptorit ovat mikrobien patogeenisia rakenteita tunnistavia molekyylejä, joita on kaikissa immuunijärjestelmän solutyypeissä sekä monissa muissa elimistön soluissa. Terveystutkimuksista kertyy jatkuvasti lisää näyttöä siitä, että näitä reseptoreita ilmentävät solut liittyvät olennaisesti erityisesti allergisten sairauksien, kuten astman, etiologiaan (Chun ym. 2009). Reseptorien aktivoituessa solut alkavat tuottaa sytokiineja, jotka ovat avainasemassa immuunireaktion käynnistämisessä. Sytokiinien määrä ja tyyppi vaikuttavat osaltaan siihen, miten hyvin elimistö pystyy torjumaan bakteerin, viruksen, sienen tai muun taudinaiheuttajan hyökkäyksen.

Solujen sytokiinivasteita on tutkittu paljon, mutta immuunijärjestelmän signalointiverkoston monimuotoisuus on hidastanut tutkimuksen etenemistä sen verran, ettei täyttä selvyyttä Toll-like-reseptorien roolista eri sairauksien synnyssä ole vielä saatu. Solujen ominaisuuksien ja sytokiinivasteiden mittausmenetelmien kehittyminen tarkemmiksi, luotettavammiksi ja tehokkaammiksi on kuitenkin nopeuttanut tiedon keruuprosessia, ja immunologiset mekanismit ovat ainakin osittain alkaneet hahmottua. Tässä opinnäytetyössä selvitettiin kirjallisuuden avulla sitä, mitä eri tutkimuksissa on selvinnyt ja miten tutkimuksia on toteutettu sekä mitkä asiat vaikuttavat saatujen tulosten oikeellisuuteen. Työn kokeellisessa osassa tutkittiin pakastamisen vaikutuksia eri Toll-like-reseptoriligandeilla käynnistettyihin solujen sytokiinivasteisiin.

2 YLEISTÄ IMMUUNIJÄRJESTELMÄSTÄ

Ihmisen immuunijärjestelmän tehtävä on suojata ja puolustaa elimistöä taudinaiheuttajilta (Abbas ym. 2007). Immuunijärjestelmä jaetaan synnynnäiseen ja hankittuun immunitettiin. Synnynnäisen immunitetin soluihin kuuluvat muun muassa fagosytoivat solut, kuten makrofagit, neutrofiilit ja NK-solut. Ne muodostavat elimistön ensilinjan puolustuksen, joka pyrkii estämään mikrobien pääsyn kudoksiin ja verenkiertoon. Synnynnäisen puolustuksen solujen kyky tunnistaa vieraita aineita on kuitenkin rajallinen. Tästä syystä ihmisellä on myös hankittu immunitetti, johon kuuluvat oleellisena osana B- ja T-solut. Hankittu immunitetti on hyvin spesifinen, ja sen merkitys kasvaa infektion pitkittyessä.

2.1 Synnynnäinen immunitetti

Synnynnäinen immunitetti koostuu fysikaalis-kemiallisista esteistä, erityyppisistä soluista ja useista veren proteiineista sekä immuunijärjestelmän solujen välisestä viestinnästä vastaavista sytokiineista (Abbas ym. 2007). Fysikaalisiin esteisiin kuuluvat elimistön ja ympäristön rajapinnat eli epiteelit kuten iho sekä ruoansulatuskanavan ja hengitysteiden epiteeli. Kemiallisen esteen muodostavat epiteelisolujen tuottamat antimikrobiset yhdisteet.

Makrofagit ja neutrofiilit sekä luonnolliset tappajasolut eli NK-solut kuuluvat synnynnäisen immunitetin soluihin (Abbas ym. 2007). Jos taudinaiheuttaja pääsee tunkeutumaan elimistön fysikaalis-kemiallisten esteiden lävitse, epiteelikerroksen alaiset *makrofagit*, jotka ovat verenkierrosta kudoksiin siirtyneitä monosyyttejä, pyrkivät fagosytoimaan ja hajottamaan sen entsyymaattisesti. Makrofagien pinnalla on reseptoreita, jotka tunnistavat mikrobeja ja niiden osia aktivoiden soluja. Kun makrofagi aktivoituu, se alkaa tuottaa lysosomaalisia entsyymejä sekä erittää sytokiineja, jotka puolestaan aktivoivat puolustusjärjestelmän muita soluja ja stimuloivat tulehdusreaktiota. Makrofagit kuuluvat myös niin sanottuihin APC-soluihin (engl. *antigen-presenting cell*), jotka esittelevät antigeeneja solukalvonsa pinnalla luokan II MHC-proteiineihin liittyneinä. *Neutrofiilit* ovat verenkierron fagosytoivia soluja, jotka hakeutuvat makrofagien tuottamien sytokiinien ohjaamana infektoituneisiin kudoksiin. *NK-solut* eivät fagosytoi mikrobeja vaan tuhoavat elimistön infektoituneita soluja eksosytoimalla sisältämiensä rakkuloiden entsyymit

suoraan kohdesolun sytoplasmaan. NK-solut tunnistavat elimistön omien solujen pinnalla esiintyvän luokan I MHC-proteiinin eivätkä siksi tuhoa isäntäsoluja. Lisäksi NK-solut reagoivat makrofagien tuottamaan interleukiini 12:een (IL-12) ja alkavat tuottaa gammainterferonia (IFN- γ), joka puolestaan aktivoi makrofageja tuhoamaan fagosytoimansa mikrobit.

Dendriittisolut (engl. *dendritic cell*, DC) ovat endosytoivia APC-soluja (Abbas ym. 2007). Ne pinosytoivat ja fagosytoivat antigeenejä elimistön epiteeleistä, kuljettavat niitä perifeerisiin imukudoksiin ja esittelevät ne hankitun immunitetin T-soluille. Dendriittisolut aktivoivat näin T-soluja ja ohjaavat niitä erilaistumaan sytotoksisiksi, auttaja- tai regulatorisiksi T-soluiksi (Abbas ym. 2007, Blanco ym. 2008). Dendriittisolut ovat näin ikään kuin sillanrakentajia synnynnäisen ja hankitun immunitetin välillä (Hänninen ja Vakkila 2003). Dendriittisoluja on elimistön kaikissa kudoksissa. Epidermoksen dendriittisoluja kutsutaan Langerhansin soluiksi (engl. *Langerhans cell*, LC), kun taas interstitiaaliset dendriittisolut (iDC) ovat tavallisia kudoksissa. Myeloidisia dendriittisoluja (mDC) esiintyy perifeeristen kudosten lisäksi imukudoksissa ja veressä (Hänninen ja Vakkila 2003, Blanco ym. 2008). Plasmasytoidiset dendriittisolut (pDC) ovat myös imukudoksissa esiintyviä soluja, ja niille on tunnuksenomaista runsas tyypin I interferonien tuotanto virusinfektiossa (Cao ja Liu 2007).

Komplementtijärjestelmä kuuluu olennaisena osana synnynnäiseen humoraaliseen immunitettiin (Abbas ym. 2007). Se koostuu plasman ja solukalvon proteiineista, jotka toimivat yhdessä kaskadimaisesti. Komplementin tehtävänä on edistää tulehdusreaktiota sekä mikrobien fagosytoosia ja hajoamista. Komplementin proteiinit opsonisoivat mikrobeja ja antigeeni-vasta-ainekomplekseja, jolloin makrofagien ja neutrofiilien on helpompi tunnistaa fagosytoitavat kohteet pintareseptoreillaan. Lisäksi komplementti helpottaa hankitun immunitetin humoraalisten vasteiden syntymistä.

Synnynnäiseen immunitettiin kuuluvat myös mikrobeille tyypillisiä molekyyliarakenteita eli PAMP:eja (engl. *pathogen-associated molecular pattern*) tunnistavat reseptorit eli PRR:t (engl. *pattern recognition receptor*), joita on solujen pinnoilla ja endosomaalisissa kalvorakenteissa (Abbas ym. 2007). Näistä reseptoreista tärkeimpiä ovat TLR:t (engl. *Toll-like receptor*), jotka tunnistavat useita erilaisia ligandeja kuten mikrobien nukleiinihappoja, sokereita, glykolipidejä ja proteiineja (ks. luku 3). Erityisesti dendriittisolut ilmentävät

monien muiden immuunijärjestelmän solujen tapaan useita PRR:iä, mukaan lukien TLR:iä, joiden alatyyppeiden määrät vaihtelevat dendriittisolun tyypistä riippuen.

2.2 Hankittu immunitetti

Hankitun immunitetin aktivoituminen vaatii antigeenin läsnäolon lisäksi synnynnäisen immunitetin aktivoitumisen seurauksena syntyneitä kostimulaattoreita, sytokiineja ja komplementin hajoamistuotteita (Abbas ym. 2007). Näistä signaaleista riippuu se, millä tavalla ja kuinka voimakkaasti hankitun immunitetin solut reagoivat. Hankitun immunitetin avainasemassa olevia soluja ovat *T- ja B-lymfosyytit*. Niille on ominaista spesifisyys antigeenien pintarakenteita kohtaan, mikä varmistaa sen, että solut reagoivat vain tiettyihin antigeeneihin. Lymfosyyteillä pitää olla myös toleranssia omia kudoksia kohtaan. Tämä kehittyy suurelta osin dendriittisolujen vaikutuksesta jo T-lymfosyyttien vasta kypsyessä kateenkorvassa. Lymfosyyteille on ominaista myös antigeenejä sitovien reseptorimolekyylien monimuotoisuus, jonka ansiosta immuunijärjestelmä pystyy tuottamaan vasteen hyvin monelle antigeenille. Antigeenialtistuksen yhteydessä osa lymfosyyteistä erilaistuu muistisoluiksi, joiden ansiosta immuunijärjestelmä reagoi voimakkaammin, jos sama antigeeni tulee elimistöön uudelleen. APC-solujen esiteltyä antigeenin naiiveille T-lymfosyyteille käynnistyy klooniekspansio eli antigeenin tunnistaneiden spesifisten lymfosyyttien jakautuminen identtisiksi lymfosyyteiksi, mikä on tarpeen, jotta immuunijärjestelmä pystyy vastaamaan jatkuvasti kasvavaan mikrobimäärään. Hankittu immunitetti reagoi lisäksi eri tavoilla eri taudinaiheuttajiin muuttamalla muun muassa B-lymfosyyttien tuottamien vasta-aineiden rakennetta. Kun antigeenit on tuhottu elimistöstä, lymfosyytit kuolevat muistisoluja lukuun ottamatta.

T-lymfosyytit voidaan jakaa toiminnallisesti kolmeen ryhmään (Abbas ym. 2007). *Tappaja-T-solut* (CD8⁺-solut, CTL) tappavat mikrobien infektoimia soluja sekä kasvainsoluja, kun taas *auttaja-T-solujen* (CD4⁺-solut; Th) tehtävänä on aktivoida makrofageja ja edistää B-solujen erilaistumista. *Säätelijä-T-solut* (T_{reg}-solut) puolestaan vaimentavat muiden T-solujen toimintoja ja säätelevät näin immuunivasteen voimakkuutta. Lisäksi ne ylläpitävät toleranssia elimistön omille kudoksille.

Auttaja-T-solut voidaan jakaa pääasiallisesti kahteen alatyyppeihin, Th1- ja Th2-soluihin (Abbas ym. 2007). Erilaistuminen näihin alatyyppeihin riippuu siitä, millaisille antigeeneille

solut altistuvat. Th-solujen erilaistuminen Th1-linjan suuntaan tapahtuu immuunijärjestelmän kohdatessa sellaisia mikrobeja, jotka aktivoivat makrofageja ja NK-soluja. Th2-erilaistuminen on puolestaan seurausta loismadoille tai allergeeneille altistumisesta. Th1- ja Th2-solut tuottavat eri sytokiineja sekä aktivoivat eri efektorimekanismeja immuunijärjestelmässä.

Muita hankitun immuniteetin soluja ovat NKT-solut sekä follikulaariset dendriittisolut (FDC) (Abbas ym. 2007). NKT-soluissa on sekä NK- että T-solujen ominaisuuksia, ja ne vaimentavat tai aktivoivat synnynnäisen ja hankitun immuniteetin vasteita. FDC:t eroavat tavallisista dendriittisoluista: niiden tehtävä on esitellä komplementin proteiineihin tai vasta-aineisiin tarttuneita antigeeneja B-lymfosyyteille.

3 SYTOKIINIT

3.1 Yleistä sytokiineista ja niiden tehtävistä immuunijärjestelmässä

Sytokiinit ovat immuunijärjestelmän solujen välisestä viestinnästä vastaavia valkuaisaineita, jotka vaikuttavat muun muassa valkosolujen aktivoitumiseen, jakautumiseen, erilaistumiseen ja kulkeutumiseen elimistön eri osiin (Kaminski ym. 2008). Kaikkiaan eri sytokiineja tunnetaan tähän mennessä yli 200 kappaletta (Zidek ym. 2009). Immuunijärjestelmää säätelevistä sytokiineista tärkeimpiä ovat interleukiinit (IL), interferonit (IFN), tuumorinekroosifaktori alfa (TNF- α) ja solutyypispesifiset kasvutekijät (Silvennoinen ja Hurme 2003). Sytokiinit eivät pääasiallisesti varastoidu soluihin, vaan solut tuottavat niitä tarvittaessa (Zidek ym. 2009). Sytokiinit muodostavat eräänlaisen efektoriverkoston, joka toimii kaskadimaisesti samalla periaatteella kuin esimerkiksi veren hyytymisjärjestelmä ja komplementti. Yksittäinen sytokiini voi toimia monessa eri säätelytehtävässä, ja vastaavasti usea sytokiini voi säädellä samaa toimintoa immuunijärjestelmässä.

Sytokiineja on funktionaalisesti kolmea päätyyppiä: synnynnäistä ja hankittua immuniteettia sääteleviä sytokiineja sekä hematopoieettisia sytokiineja (Abbas ym. 2007). Synnynnäisen immuniteetin sytokiineja ovat muun muassa TNF- α sekä IL-1 ja IL-12, ja niitä tuottavat pääasiassa makrofagit ja NK-solut. Hankitun immuniteetin sytokiineja kuten IL-2:ta, IL-4:ää ja IL-5:tä tuottavat puolestaan T-lymfosyytit. On myös sytokiineja, jotka

säätävät sekä synnynnäistä että hankittua immuniteettia. Tällainen on esimerkiksi gammainterferoni (IFN- γ). Hematopoieettisia sytokiineja kuten IL-3:a ja IL-7:ää sekä muita solutyypispesifisiä kasvutekijöitä, kuten granulosyytti-monosyytti-kolonioita stimuloivaa tekijää (GM-CSF), tuottavat pääasiassa luuytimen stroomasolut.

Sytokiinit voidaan jakaa funktionaalisesti myös pro- ja anti-inflammatorisiin sytokiineihin sen mukaan, edistävätkö ne tulehdusreaktiota vai eivät (Silvennoinen ja Hurme 2003) (Kuva 3). Lisäksi ne voidaan jakaa eri kategorioihin sen mukaan, mikä alatyypin T-soluista niitä tuottaa (Kaminski ym. 2008). Th1-solulinjan tuottamia sytokiineja ovat muun muassa IL-2 ja IL-15, IFN- γ ja TNF- β (Zidek ym. 2009). Th2-solulinja tuottaa puolestaan IL-4:ää, IL-5:tä, IL-6:ta, IL-9:ää, IL-10:tä ja IL-13:a. Th1-solulinjan tuottamat sytokiinit aktivoivat pääasiallisesti soluvälitteisen immuniteetin mekanismeja ja estävät solunsisäisten patogeenien kuten bakteerien, virusten ja sienten sekä tuumorisolujen kasvua (Kaminski ym. 2008, Zidek 2009). Th2-solut edistävät puolestaan vasta-ainevälitteisen immuniteetin vasteita ja estävät solunulkoisten loisten kasvua hilliten samalla fagosytoosia. Th1- ja Th2-solujen määrällisellä suhteella on suuri merkitys immuunipuolustuksen homeostaasin ylläpitämisessä (Silvennoinen ja Hurme 2003). Auttaja-T-solujen erilaistuminen Th1:n suuntaan estää Th2-solujen kehittymistä ja päinvastoin, ja muun muassa useiden tulehduksellisten sekä autoimmuni- ja neurodegeneratiivisten sairauksien epäilläänkin liittyvän juuri tämän tasapainon järkkymiseen (Zidek ym. 2009).

Proinflammatoriset
IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-17 A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17F, IL-18, IL-23, IL-27, IFN- γ
Anti-inflammatoriset
IL-4, IL-10, IL-13, IL-25, TGF- β , IL-1Ra, IL-18BP

Kuva 3. Pro- ja anti-inflammatoriset sytokiinit (Silvennoinen ja Hurme 2003).

Sytokiinit välittävät vaikutuksensa auto- tai parakriinisesti sitoutumalla kohdesolujensa pinnalla oleviin sytokiinireseptoreihin, jotka ovat yhteydessä toisiolähetteinä toimiviin tyrosiinkinasaaseihin (Decker 2006). Joskus hyvin voimakas sytokiinituotanto voi johtaa siihen, että sytokiineja (esimerkiksi TNF- α :aa) pääsee systeemiseen verenkiertoon, jolloin ne vaikuttavat endokriinisesti ja voivat saada aikaan septisen shokkitilan (Abbas ym. 2007). Solujen herkkyyteen sytokiineille vaikuttaa sytokiinireseptorien ekspressio, joka vaihtelee solutyypeittäin ja jota säätävät ulkoiset signaalit kuten antigeenialtistus.

Sytokiinien sitoutuessa kohdesolujensa sytokiinireseptoreihin ne saavat aikaan muutoksia geeniekspressiossa, mikä johtaa esimerkiksi kohdesolun proliferaatioon. Kohdesolujen vasteita säätelevät tiukat inhibitoriset palautemekanismit. Sytokiini voi aiheuttaa varsinaisen vaikutuksensa lisäksi esimerkiksi sytokiinireseptori-inhibiittoreita koodaavan geenin induktion, mikä johtaa vasteen heikkenemiseen.

Sytokiinireseptorit voidaan jakaa reseptoriperheisiin niiden rakenteen ja toiminnan mukaan (Decker 2006, Zidek ym. 2009). Sytokiinireseptorit koostuvat pääasiassa useasta alayksiköstä, joiden erilaiset yhdistelmät vaikuttavat kunkin sytokiinimolekyylin reseptoriaffiniteettiin. Kemokiinireseptorit poikkeavat muista sytokiinireseptoreista siten, että ne ovat G-proteiinikytkentäisiä (Goncharova ja Tarakanov 2008). Sekä kemokiini- että muut sytokiinireseptorit muistuttavat kuitenkin avaruudelliselta rakenteeltaan TLR:iä, mikä viittaa siihen, että myös niiden toimintamekanismit ovat samankaltaiset.

3.2 Tärkeimmät synnynnäisen immunitetin sytokiinit

TNF- α eli *TNF* on synnynnäisen immunitetin pääasiallinen tulehdusvasteen välittäjä (Abbas ym. 2007). Aktivoituneet makrofagit tuottavat suurimman osan *TNF*:stä. Sen pääasiallinen tehtävä on neutrofiilien ja monosyyttien rekrytointi infektiotalueelle sekä niiden aktivoiminen patogeenien eliminoimiseksi. Tämä tapahtuu, kun *TNF*:ää tuotetaan pieninä (<nM) pitoisuuksina. Suuremmat pitoisuudet aiheuttavat systeemisiä oireita kuten kuumetta. Mikäli plasman *TNF*-pitoisuus nousee hyvin korkeaksi (>10⁷ M), syntyy septinen shokkitila. Tämä heikentää sydänlihaksen supistusvoimaa, aiheuttaa hypoglykemiaa ja voi olla hengenvaarallinen. *TNF* indusoi myös solujen apoptoosia.

IL-1:n fysiologiset vaikutukset ovat pitkälti samanlaiset kuin *TNF*:n (Abbas ym. 2007). *IL-1* ei kuitenkaan aiheuta septistä shokkia eikä indusoi apoptoosia kuten *TNF*. *IL-1*:llä on kaksi alatyyppeä, *IL-1 α* ja *IL-1 β* , jotka molemmat ovat biologisesti samanarvoisia. *IL-1 α* toimii kuitenkin proinflammatorisen vaikutuksensa lisäksi solunsisäisenä transkription säätelytekijänä, kun taas *IL-1 β* lisää endoteelisolujen adheesiomolekyylien ilmentymistä ja edistää diapedeesiä (Barksby ym. 2007).

IL-12:ta tuotetaan solunsisäisten mikrobien aiheuttamassa infektiossa. Sitä erittävät aktivoituneet dendriittisolut ja makrofagit. *IL-12* stimuloi NK-soluja ja T-lymfosyyttejä

tuottamaan gammainterferonia (IFN- γ), joka puolestaan aktivoi makrofageja tappamaan fagosytoimansa taudinaiheuttajat. IL-12:n ja IFN- γ :n yhteisvaikutuksesta CD4⁺-solut alkavat erilaistua Th1-soluiksi, jotka tuottavat IFN- γ :aa. Lisäksi IL-12 lisää NK-solujen ja CD8⁺-solujen sytotoksista toimintaa.

Tyypin I interferoneja eli IFN- α :aa ja IFN- β :aa tuotetaan virusinfektioissa (Abbas ym. 2007). Niiden toiminta perustuu viruksen replikaatiota soluissa estävään vaikutukseen. Tyypin I interferonit lisäävät luokan I MHC-proteiinien sekä koaktivaattoreiden ilmentymistä solujen pinnalla, mikä tehostaa sytotoksisten solujen toimintaa (Abbas ym. 2007, Meyer 2009). Tyypin I interferonit edistävät IL-12:n ja IFN- γ :n tapaan Th1-solujen kehittymistä. Lisäksi IFN- α ja - β lisäävät kemokiinien ja kemokiinireseptorien tuotantoa sekä stimuloivat makrofagien kehittymistä, aktivaatiota ja indusoituvan typpioksidisyntaasin (iNOS) tuotantoa (Meyer 2009). Ne vaikuttavat myös T-soluihin lisäämällä sekä niiden proliferaatiota että myös apoptoottisten molekyylien ilmentymistä. Myös B-solujen proliferaatio lisääntyy. Tyypin I interferoneilla on myös verisuonten uudismuodostusta estävä vaikutus.

IL-10 inhiboi makrofagien ja dendriittisolujen toimintaa estämällä niiden IL-12:n, kostimulaattorimolekyylien ja luokan II MHC-proteiinien tuotantoa (Abbas ym. 2007). Se vaikuttaa siis tulehdusreaktiota hillitsevästi ja estää sekä Th1- että Th2-sytokiinien tuotantoa (Zidek ym. 2009). Lisäksi sillä on antifibroottinen vaikutus, mistä voi olla terapeutista hyötyä esimerkiksi maksakirroosipotilaiden hoidossa.

Kemokiinit ovat kemotaktisia sytokiineja, joiden tuotanto lisääntyy tulehdusreaktiossa (Abbas ym. 2007). Niitä tuottavat lähes kaikki elimistön solut (Zidek ym. 2009). Proinflammatoriset ja Th1-sytokiinit stimuloivat kemokiinien tuotantoa, kun taas Th2- ja T_{reg}-sytokiinit vähentävät niiden tuotantoa. Kemokiinit rekrytoivat puolustusjärjestelmän soluja infektiialueelle sekä säätelevät lymfosyyttien ja muiden valkosolujen liikkumista perifeeristen imukudosten läpi. Kemokiineilla on myös muita tehtäviä kuten verisuonten uudismuodostuksen ja haavan paranemisen edistäminen sekä osallistuminen organogeneesiin.

3.3 Tärkeimmät hankitun immuniteetin sytokiinit

IFN- γ on tärkeä sytokiini sekä synnynnäisen että hankitun immuniteetin vasteiden syntymisessä (Abbas ym. 2007). Se aktivoi makrofageja tappamaan niiden fagosytoimat mikrobit ja edistää $CD4^+$ -solujen erilaistumista Th1-suuntaan sekä B-solujen vasta-aineiden vaihtumista IgG:ksi. Lisäksi se stimuloi luokan I ja II MHC-proteiinien ja kostimulaattoreiden ilmentymistä antigeeniä esittelevissä soluissa.

IL-2 edistää T-lymfosyyttien kasvua ja erilaistumista, mutta se myös säätelee niiden vasteita vaikuttamalla säätelijä-T-soluihin (Abbas ym. 2007). *IL-2*:ta tuottavat lähinnä $CD4^+$ -solut, ja se edistää NK-solujen proliferaatiota ja erilaistumista. *IL-4* puolestaan stimuloi B-solujen vasta-ainetuotannon muuttumista IgE-painotteiseksi sekä Th2-solujen kasvua ja kehittymistä $CD4^+$ -soluista. Samalla *IL-4* estää auttaja-T-solujen erilaistumista Th1-soluiksi. *IL-5* on eosinofiilien kasvua ja erilaistumista edistävä sytokiini, jonka tuotanto lisääntyy loismatoinfektioissa. Lisäksi se stimuloi B-solujen proliferaatiota ja IgA-vasta-ainetuotantoa. *IL-5* edistää myös basofiilien kasvua sekä niiden adheesiota ja kulkeutumista elimistön eri kudoksiin (Valent ja Dahinden 2009). *IL-13* on toiminnallisesti *IL-4*:n kaltainen (Abbas ym. 2007). Se muun muassa indusoi IgE-luokan vasta-aineiden muodostusta B-soluissa. *IL-4*:stä poiketen *IL-13* edistää kroonisissa tulehdustiloissa sidekudoksen muodostumista, stimuloi liman tuotantoa keuhkoepiteelisoluissa sekä indusoi endoteelin adheesiomolekyylien ilmentymistä edistäen näin tulehdusreaktiota.

TGF- β :n (engl. *transforming growth factor*) pääasiallinen vaikutus immuunijärjestelmässä on T-solujen efektoritoimintojen ja makrofagien aktivaation esto (Abbas ym. 2007). Lisäksi se säätelee T-solujen alatyypin erilaistumista ja kudosaaurioiden korjaamista tulehduksen jälkeen. *TGF- β* vaikuttaa myös B-soluihin stimuloimalla IgA-vasta-aineiden tuotantoa ja estää Th1- ja Th2-tyypistä sytokiinivastetta kuten *IL-10* (Zidek ym. 2009).

3.4 Hematopoieettiset sytokiinit

Hematopoieettiset sytokiinit edistävät vielä erilaistumattomien solujen kehittymistä tietyn linjan soluiksi (Abbas ym. 2007). Kantasolutekijä SCF (engl. *stem cell factor*) ja *IL-3* indusoiivat kaikkia solutyyppisiä, kun taas *IL-7* indusoi spesifisti T- ja B-lymfosyyttejä.

Granulosyyteille ja monosyyteille on omat hematopoieettiset sytokiinininsa: granulosyyteille G-CSF (engl. *granulocyte colony-stimulating factor*) ja monosyyteille M-CSF. Sekä granulosyyttejä että monosyyttejä stimuloiva GM-CSF indusoi myös makrofagien aktiivisuutta.

3.5 Sytokiinien mittaussmenetelmät

3.5.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA on sytokiinien mittaamisessa yleisimmin käytetty menetelmä. Kuten useimmat muutkin sytokiinien mittaamiseen käytettävät menetelmät, ELISA perustuu vasta-aineiden ja indikaattorimolekyylien käyttöön (Abbas ym. 2007). Kuoppalevyn kuoppien pohjalle kiinnitetty vasta-aine sitoo näytteestä antigeenina toimivan sytokiinin, johon puolestaan entsyymillä merkattu vasta-aine sitoutuu (Leng ym. 2008). Substraattiliuoksen lisääminen kuoppaan saa aikaan entsyymaattisen reaktion, joka on havaittavissa liuoksen värin vaihtumisena. Kompetitiivisessä ELISA:ssa sekä näytteen sytokiinit että entsyymiin sidotut sytokiinit reagoivat kuoppalevyn vasta-aineiden kanssa, jolloin vasta-aineen ja entsyymiin sidottujen sytokiinien muodostamien kompleksien määrä on kromogeenisubstraattiliuoksen kanssa reagoituaan suhteessa maljan absorbanssiin (Choi ym. 2007). Kompleksipitoisuus pienenee vapaan sytokiinin pitoisuuden suurentuessa näytteessä, joten mitattava signaali on sitä heikompi, mitä enemmän sytokiinia on näytteessä.

3.5.2 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Sytokiinien kvantitatiivinen määrittäminen proteiinitasolla on hankalaa, koska niiden määrät ovat hyvin pieniä (Giulietti ym. 2001). Tästä syystä sytokiinivasteita mitattaessa käytetäänkin usein reaaliaikaista RT-PCR-menetelmää, jolla mitataan valmiin proteiinin sijasta mRNA:n määrää. Se perustuu polymeerasiketjureaktioon (engl. *polymerase chain reaction, PCR*), jossa kuumuutta kestävä polymeerasientsyymi (engl. *reverse transcriptase, RT*) tuottaa RNA:sta lämpötilavaihtelujen avulla sykleittäin komplementaarista DNA:ta (Kubista ym. 2006). Menetelmässä käytetään sekvenssispesifisiä primeerejä eli alukkeita. Syntyneiden tuotteiden määrä pystytään määrittämään fluoresoivien ilmaisimolekyylien avulla polymeerasiketjureaktion edetessä reaaliajassa.

3.5.3 Multiplex-menetelmät

Sytokiinianalyysissä multipleksointi (engl. *multiplexing*) tarkoittaa useamman analyytin samanaikaista mittaamista yhden kokeen aikana (Lash ym. 2006). Multiplex-tekniikoita on pääasiassa kahden tyyppisiä. Multiplex ELISA -tekniikoissa perinteinen ELISA-teknologia on yhdistetty microspot-teknologiaan, jossa sytokiinien detektoimisessa käytetään perinteisen ELISA:n värireaktion sijaan herkempiä kemi- tai elektrokemiluminesenssia (Leng ym. 2008). Niillä pystytään mittaamaan samasta näytteestä usean eri sytokiinin pitoisuus. Multiplex ELISA:an perustuvia menetelmiä ovat esimerkiksi SearchLight™ ja FAST Quant®. Helmiin perustuvissa tekniikoissa (engl. *bead-based assays*), kuten Luminexissa ja CBA:ssa (engl. *cytometric bead array*), vasta-aineet on liitetty joko fluoresoivalla väriaineella tai streptavidiinilla leimattuihin helmiin, joita pystytään mittaamaan virtausytometrillä (Lash ym. 2006, Leng ym. 2008). Helmiä käyttävät menetelmät mahdollistavat useiden kymmenien eri sytokiinien samanaikaisen mittauksen (Leng ym. 2008).

Edellä mainittujen multiplex-tekniikoiden herkkyydessä ja mittaustarkkuudessa on eroja: esimerkiksi SearchLight™ on herkin (alin mittauspitoisuus 0,78–1,56 pg/ml), kun taas FAST Quant®:lla on laajin mittausalue (6,1–25000 pg/ml) (Lash ym. 2006). Vaikka FAST Quant® -laitteisto on SearchLight™- ja Luminex-järjestelmiä huomattavasti edullisempi, menetelmien käyttökustannuksissa ei kuitenkaan ole suuria eroja. Markkinoilla on kaikkiin edellä mainittuihin määritystekniikoihin saatavilla runsaasti eri analyyttejä.

Kaikkien multiplex-proteiinianalyysiä hyväksi käyttävien menetelmien etuna on perinteiseen ELISA:an verrattuna merkittävästi pienemmän näytetilavuuden (50–100 mikrolitraa) tarve (Lash ym. 2006). Lisäksi ne ovat nopeita ja kustannustehokkaita menetelmiä, jotka mahdollistavat tiettyjen sytokiinipaneelien toistuvat mittaukset samoista tutkimukseen osallistuvista henkilöistä samoissa olosuhteissa. Tämä on selkeä etu tulosten luotettavuuden ja vertailtavuuden kannalta. On kuitenkin huomattava, että perinteisellä ELISA:lla ja multiplex-menetelmällä saatujen mittaustulosten yhtäpitävyys on parempi kudosviljelmien supernatanttinäytteillä kuin seerumi- ja plasmanäytteillä (Leng ym. 2008). Multiplex-menetelmissä vasta-aineiden ja sytokiinien väliset interaktiot ovat mahdollisia, minkä takia sytokiinin reagoimattomuus kaikkien muiden vasta-aineiden kanssa tulee varmistaa. Seerumi- ja plasmanäytteissä verenkierron runsaslukuiset

proteiinit voivat vaikuttaa tuloksiin erityisesti helmiin perustuvissa menetelmissä, joissa antigeeni-vasta-ainekompleksit pääsevät muodostumaan ELISA:sta poiketen vapaasti immobilisoitumatta kuoppalevyn kuoppien pohjalle.

3.5.4 Muut mittausmenetelmät

Muita sytokiiniin mittaamisessa käytettyjä menetelmiä ovat ELISPOT, ICCS ja LDA sekä RNase protection assay, ISH ja immunohisto- ja immunosytokemialliset menetelmät (Pala ym. 2000). Näistä ELISPOT, ICCS ja LDA soveltuvat sytokiineja tuottavien solujen määrän mittaamiseen (Pala ym. 2000). *ELISPOT* on ELISA:n muunnos, jossa solut joko viljellään suoraan vasta-ainepäälysteisiin kuoppiin ennen stimulointia tai niitä stimuloidaan *in vitro* ennen solususpension lisäämistä kuoppiin (Meierhoff ym. 2002). Solujen erittäessä sytokiineja muodostuu sytokiini-vasta-ainekomplekseista rengasmaisia täpliä (engl. *spot*), joiden koon ja muodon perusteella pystytään päättelemään yksittäisten solujen tuottamien sytokiiniin laatu ja kinetiikka. Solujen erittämät sytokiinit eivät laimennu supernatanttiin eivätkä kiinnity viereisten solujen sytokiinireseptoreihin, minkä ansiosta ELISPOT on ELISA:a herkempi menetelmä.

ICCS (engl. *intracellular cytokine staining*) on menetelmä, jossa solun tuottamien sytokiiniin erityis solun ulkopuolelle estetään lisäämällä brefeldiini A:ta 1–2 tuntia solujen stimuloinnin aloituksesta (Letsch ja Scheibenbogen 2003). Tämä johtaa sytokiiniin kertymiseen solun sisälle. Solujen permeabilisaation ja fiksaation jälkeen sytokiinit voidaan tunnistaa spesifisiä fluoresoivia vasta-ainekonjugaatteja ja väriaineita apuna käyttäen virtaussytometrillä. LDA:n (engl. *limiting dilution assay*) käyttö sytokiiniin määrittämisessä perustuu aktiivisten solujen frekvenssin määrittämiseen näytteiden asteittaista laimentamista hyväksi käyttäen (Hu ja Smyth 2009).

RNase protection assay on nukleinihappotason menetelmä, jossa mitattavan sytokiiniin RNA-sekvenssille komplementaarinen, esimerkiksi radioaktiivisesti leimattu RNA-jakso sekoitetaan soluista eristetyn RNA-aineksen kanssa (Sauder ym. 2008). Tämän jälkeen komplementaariset juosteet hybridisoidaan kaksijuosteiseksi RNA:ksi. Seokseen lisätään yksijuosteista RNA:ta pilkkovaa ribonukleasientsyymiä, jolloin yksijuosteiset RNA-jaksot hajoavat ja haluttu RNA-jakso säilyy ehjänä. Tämän määrä voidaan mitata autoradiografisesti.

ISH (engl. *in situ hybridization*) sekä immunohisto- ja immunosytokemialliset menetelmät ovat sytokiiniin mittaamisessa melko harvinaisia. Niitä käytetään lähinnä sytokiineja tuottavien solujen paikantamiseen kudoksissa (Pala ym. 2000), eivätkä ne näin ollen kuulu tämän työn piiriin.

3.6 Sytokiiniääritysten luotettavuuteen vaikuttavat tekijät

Sytokiiniin määrittämisen luotettavuuteen ja toistettavuuteen vaikuttavat useat menetelmistä riippumattomat tekijät, kuten näytteenoton ajankohta sekä näytteen käsittely ja säilytys (de Jager ym. 2009). Meyerin (2008) työryhmä havaitsi tutkimuksessaan, että viive kokoverellä tehdyissä stimulaatiotutkimuksissa aiheuttaa sekä määrällisiä että laadullisia muutoksia solujen sytokiinituotantoon. Erityisesti plasmasytoidisten dendriittisolujen IFN- α -tuotanto heikentyi huomattavasti jo kuuden tunnin viiveestä. Myös näytteen käsittelyllä saattaa olla ratkaiseva merkitys solujen sytokiinivasteen kannalta. Elkordin (2004) tutkimusryhmä todisti monosyyttien eristysmenetelmiä vertailevassa tutkimuksessaan, että monosyyttien erottelu positiivisella valinnalla CD14-vasta-ainetta käyttäen estää monosyyteistä johdettujen dendriittisolujen lipopolysakkaridin indusoimaa sytokiinivastetta, kun taas solujen erottelu adherenssimenetelmää käyttäen tuottaa puolestaan korkeammat sytokiinipitoisuudet.

Solujen pakastaminen ennen niiden stimulointia voi vaikuttaa merkittävästi niiden kykyyn tuottaa sytokiineja. Oikonen (1996) tutki pakastuksen vaikutusta leukosyyttien biokemiallisiin toimintoihin. Hän totesi, että muun muassa lymfosyytit, monosyytit ja makrofagit sekä niiden pintarakenteet kestävät pääasiallisesti melko hyvin pakastamista, kun taas granulositytit menettävät toimintakykynsä kokonaan. Tämä johtuu niiden herkkyydestä osmoottisen paineen muutoksille. Hyperosmoottista stressiä pyritäänkin vähentämään solujen pakastamisen yhteydessä käytettävällä suoja-aineella, dimetyylisulfoksidilla (DMSO). Solut voivat vaurioitua myös, jos niiden sisään pääsee muodostumaan jääkiteitä. Tämä pyritään välttämään jäähdyttämällä solut hyvin hitaasti, noin yhden celsiusasteen tuntivauhtia.

Idan (2006) työryhmä vertaili dendriittisolujen toiminnallisuutta määrittävässä tutkimuksessaan jäädytettynä säilytettyjen ja tuoreiden perifeerisen veren mononukleaaristen solujen eli PBMC-solujen (engl. *peripheral blood mononuclear cell*)

sytokiinituotantoa. Työryhmä havaitsi, että jäädytettynä säilytettyjen näytteiden solut eivät tuottaneet juuri lainkaan IFN- α :aa TLR-stimulaation seurauksena. Lisäksi työryhmä totesi, että dendriittisolujen toiminnalliset kokeet kannattaa tehdä kokoverinäytteillä, koska mittaukset ovat siten luotettavampia ja yksinkertaisempia kuin PBMC-soluilla. Damsgaardin (2008) tutkimusryhmä päätyi monosyyttien sytokiinituotantoa vertailevassa tutkimuksessaan siihen lopputulokseen, että kokoveren käyttö mittauksissa tekee menetelmästä myös toistettavamman ja edullisemman.

On kuitenkin huomattava, etteivät kaikki kokoverinäytteet ole vertailukelpoisia. Erikssonin työryhmän (2007) terveiden lasten ja aikuisten kokoverellä tekemässä *in vitro* -tutkimuksessa selvisi, että kapillaari- ja laskimoverinäytteiden sytokiinipitoisuudet eivät ole vertailukelpoiset. Työryhmä stimuloi verinäytteitä TLR2- ja TLR4-ligandeilla ja havaitsi, että sekä lasten että aikuisten IL-10:n tuotanto oli korkeampi kapillaarinäytteessä, jossa myös TNF- α -pitoisuus oli suurempi ennen stimulaatiota. Kimuran työryhmän (2007) kokoverellä tekemä *ex vivo* -tutkimus osoitti, että myös veren hiilidioksidipitoisuudella voi olla vaikutusta sytokiinivasteisiin. Tutkimuksessa mitattiin terveiden hyper- ja hypokapnisten koehenkilöiden TLR4-stimulaation aiheuttamaa TNF- α -, IL-1 β -, IL-10- ja IL-6-vastetta. Työryhmä totesi hyperkapnian alentavan näiden sytokiinien pitoisuuksia näytteissä. Dorresteijnin työryhmä (2005) puolestaan selvitti *in vivo* -tutkimuksessaan esinesteytyksen vaikutuksia lipopolysakkaridin indusoimaan sytokiinivasteeseen. Nesteytys toteutettiin infusoimalla koehenkilöille 1,5 litraa glukoosi-keittosuolaliuosta (2.5 % / 0.45 %) tuntia ennen stimulaatiota. Tutkimuksessa selvisi, että esinesteytetyn ryhmän proinflammatoriset TNF- α , IL-1 β ja IL-8 kohosivat vähemmän kuin ryhmän, jota ei ollut esinesteytetty. Tutkimuksen perusteella hyvä nesteytystila voi lieventää proinflammatorista sytokiinivastetta.

Myös verinäytteen antikoagulantin valinta voi vaikuttaa sytokiinien mittaustulokseen: de Jagerin (2009) työryhmä havaitsi tutkimuksessaan, että sitraatilla käsitellyn näytteen IL-6-pitoisuus oli selvästi hepariinilla ja EDTA:lla käsiteltyjä korkeampi, kun taas kemokiini CXCL8:n pitoisuus oli korkein seeruminäytteessä. Lisäksi erityisesti tulehduksellisia sairauksia tutkittaessa useat endogeeniset plasman proteiinit kuten komplementin ja akuutin vaiheen proteiinit saattavat vaikuttaa sytokiinimittausten tuloksiin.

Mittaustulosten luotettavuuden varmistamiseksi näytteet tulisi siis käsitellä mahdollisimman pian, kuitenkin viimeistään tunti näytteenoton jälkeen (de Jager ym. 2009). Näytteet säilyvät vakaassa -80 °C:n lämpötilassa kahden vuoden ajan, minkä jälkeen sytokiinipitoisuudet alkavat laskea merkittävästi eikä saataviin tuloksiin voi näin ollen enää luottaa. Näytteet eivät saa päästä sulamaan ennen mittausten aloittamista, koska sulamis-jäätymissyklit vaikuttavat useimpien sytokiinien pitoisuuksia vähentävästi. Lisäksi tulisi aina käyttää sisäistä kontrollinäytettä, joka säilytetään muiden näytteiden kanssa samoissa olosuhteissa.

4 TOLL-LIKE-RESEPTORIT

4.1 Yleistä

Synnyinäisen immunitetin solut ilmentävät useita erilaisia patogeenisiä rakenteita tunnistavia reseptoreita eli PRR:iä (Kumar ym. 2009a). PRR:ien tunnistamat rakenteet eli PAMP:t ovat mikrobeille ominaisia ja välttämättömiä. Myös syöpäsolujen pintarakenteet voivat toimia PAMP:eina. Toll-like-reseptorit (TLR) kuuluvat Toll-proteiiniperheeseen, joka löydettiin alun perin banaanikärpäsestä (*Drosophila melanogaster*) (Salaun ym. 2007). TLR:t kuuluvat PRR:iin, ja muita PRR-perheitä ovat mm. RLR (engl. *Retinoic acid-inducible gene-1-like receptor*) ja NLR (engl. *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*). PRR:t voivat sijaita solukalvolla tai solun sisäosissa, ja niiden aktivoitumisen seurauksena solu alkaa tuottaa sytokiineja, jotka käynnistävät tulehdusreaktion, säätelevät puolustusjärjestelmän muiden solujen vasteita ja saavat aikaan myös hankitun immuunipuolustuksen aktivoitumisen.

TLR:ien aktivoituminen ja sitä seuraava sytokiinituotanto stimuloi dendriittisolujen kypsymistä sekä tehostaa APC-solujen antigeenien soluunottoa ja tarjontaa (Wang ym. 2008). Lisäksi CD4⁺-solut aktivoituvat ja alkavat erilaistua Th1- ja Th2-soluiksi. TLR-aktivaatio voi johtaa myös ohjelmoituun solukuolemaan eli apoptoosiin (Salaun ym. 2007). Erityisesti TLR:ien 2–5 ja 7–9 aktivaatio on yhdistetty proinflammatoristen sytokiinien tuottamisen lisäksi proapoptoottisten signaalimolekyylien tuotannon lisääntymiseen.

Nisäkkäistä on löydetty yhteensä kolmetoista erilaista TLR:ää, mutta näistä toimivina proteiineina vain kymmentä on tavattu ihmisellä (Kumar ym. 2009b). TLR:iä on

varsinaisten immuunijärjestelmän solujen lisäksi mm. fibroblasteissa sekä epiteeli- ja endoteelisoluissa. TLR:istä solukalvoreseptoreita ovat TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 ja TLR6 sekä TLR11, jota ei tosin ole ihmisellä. Solun sisä rakenteissa kuten solulimakalvostossa ja solunsisäisissä rakkuloissa on puolestaan TLR3-, TLR7-, TLR8- ja TLR9-reseptoreita. Niiden ligandit siirtyvät solun sisälle usein kationisten liposomien kanssa muodostamissaan komplekseissa (Matsumoto ja Seya 2007). TLR7:n, TLR8:n ja TLR9:n sijaintia solun sisällä pidetään tärkeänä omien ja elimistölle vieraiden rakenteiden erottamisen kannalta (Wang ym. 2008). Lisäksi kaikki solunsisäiset TLR:t tunnistavat virusten nukleiinihappoja, minkä takia niiden sijainti on tarkoituksenmukainen: useimmat virukset joutuvat kosketuksiin endosomaalisten kalvojen kanssa joko virusten tunkeutuessa sisälle soluun, viruksen kapsidin hajotessa ja vapauttaessa genomin tai virusten kokoamis- tai silmukointivaiheessa (Thompson ja Iwasaki 2008).

TLR:iä on löydetty lähes kaikista ihmisen kudoksista, ja monista kudoksista on löydetty kaikkia TLR-tyyppejä (Sandor ja Buc 2005). Eri solutyypeissä on myös eri määrät TLR:iä. Eniten eri alatyypin TLR:iä on fagosytoivissa soluissa. Taulukkoon 1 on koottu immuunijärjestelmän eri solujen ilmentämiä TLR:iä.

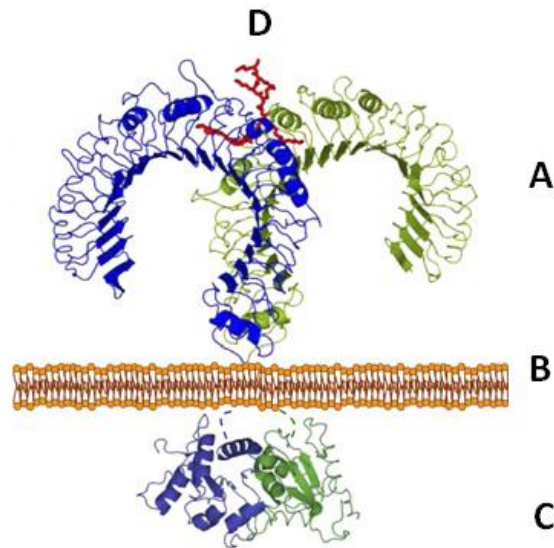
Taulukko 1. Ihmisen TLR:ien ilmentyminen immuunijärjestelmän soluissa (koottu eri lähteistä: Kumar ym. 2009b; Blanco ym. 2008; Funderburg ym. 2008; Henning ym. 2008; Diebold 2007; van Duin ja Shaw 2007; Komiya ym. 2006; Galli ym. 2005; Sandor ja Buc 2005; Xu D ym. 2005; Iwasaki ja Medzhitov 2004). X=TLR:n ilmentyminen todettu proteiinina. (X)=TLR:n ilmentyminen todettu vain mRNA:na. Taulukossa käytetyt lyhenteet: MF=makrofagi, MO=monosyytti, NF=neutrofiili, EF=eosinofiili, BF=basofiili, SS=syöttösolu, NK=NK-solu, pDC=plasmasytoidinen dendriittisol, mDC=myeloidinen dendriittisol, iDC=interstitiaalinen dendriittisol, LC=Langerhansin solu, T=T-lymfosyytti, B=B-lymfosyytti.

	MF	MO	NF	EF	BF	SS	NK	pDC	mDC	iDC	LC	T	B
TLR1	X	X	X	(X)	X	(X)		X	X				X
TLR2	X	X	X	X	X	X			X	X		X	X
TLR3						X	X		X	X	X	(X)	X
TLR4	X	X	X	(X)	X	X			X	X		X	X
TLR5	X	X	X	X		X			X	X		(X)	
TLR6	X	X	X	X	X	(X)		X	X				X
TLR7	X	X	X	X		X		X	X			(X)	X
TLR8	X	X	X						X			(X)	
TLR9	X	X	(X)	(X)	X	X	X	X				(X)	X
TLR10	X	X	X	(X)	X			X	X				X

Useamman eri TLR:n samanaikaisella aktivaatiolla on havaittu olevan synergistisiä vaikutuksia solujen joidenkin sytokiinien tuotannon säätelyyn (Trinchieri ja Sher 2007). Esimerkiksi dendriittisolujen stimulointi useammalla kuin yhdellä TLR-agonistilla samanaikaisesti aiheuttaa moninkertaisen sytokiinituotannon. Napolitanin (2005) työryhmän tutkimuksessa kävi ilmi, että TLR3 ja TLR4 toimivat synergistisesti TLR7:n, TLR8:n ja TLR9:n kanssa. Näitä reseptoreita samanaikaisesti stimuloiden IL-12:n ja IL-23:n tuotanto lisääntyi merkittävästi. Myös Gautier (2005) kollegoineen sai tutkimuksessaan tuloksia, jotka viittaavat eri TLR:ien samanaikaisen aktivoitumisen johtavan synergistiseen sytokiinivasteeseen. Tutkimuksessa monosyyteistä johdettujen dendriittisolujen stimulointi resikimodilla (TLR7/8-ligandi) ja lipopolysakkaridilla (TLR4-ligandi) tai polyinosiini-polysytidyylilihapolla (TLR3-ligandi) tuotti tavallista korkeampia IL-12p70-pitoisuuksia. TLR:ien samanaikainen aktivaatio voi johtaa myös vasteen negatiiviseen säätelyyn. Ren ja Stromingerin (2004) tutkimuksesta selvisi, että TLR2-agonistit pystyvät salpaamaan TLR3- ja TLR4-agonistien normaalin IP-10-, IL-12p35- ja IFN- γ -tuotannon. TLR2-agonisteilla ei kuitenkaan ollut vaikutusta IL-15:een eikä IFN- β :aan.

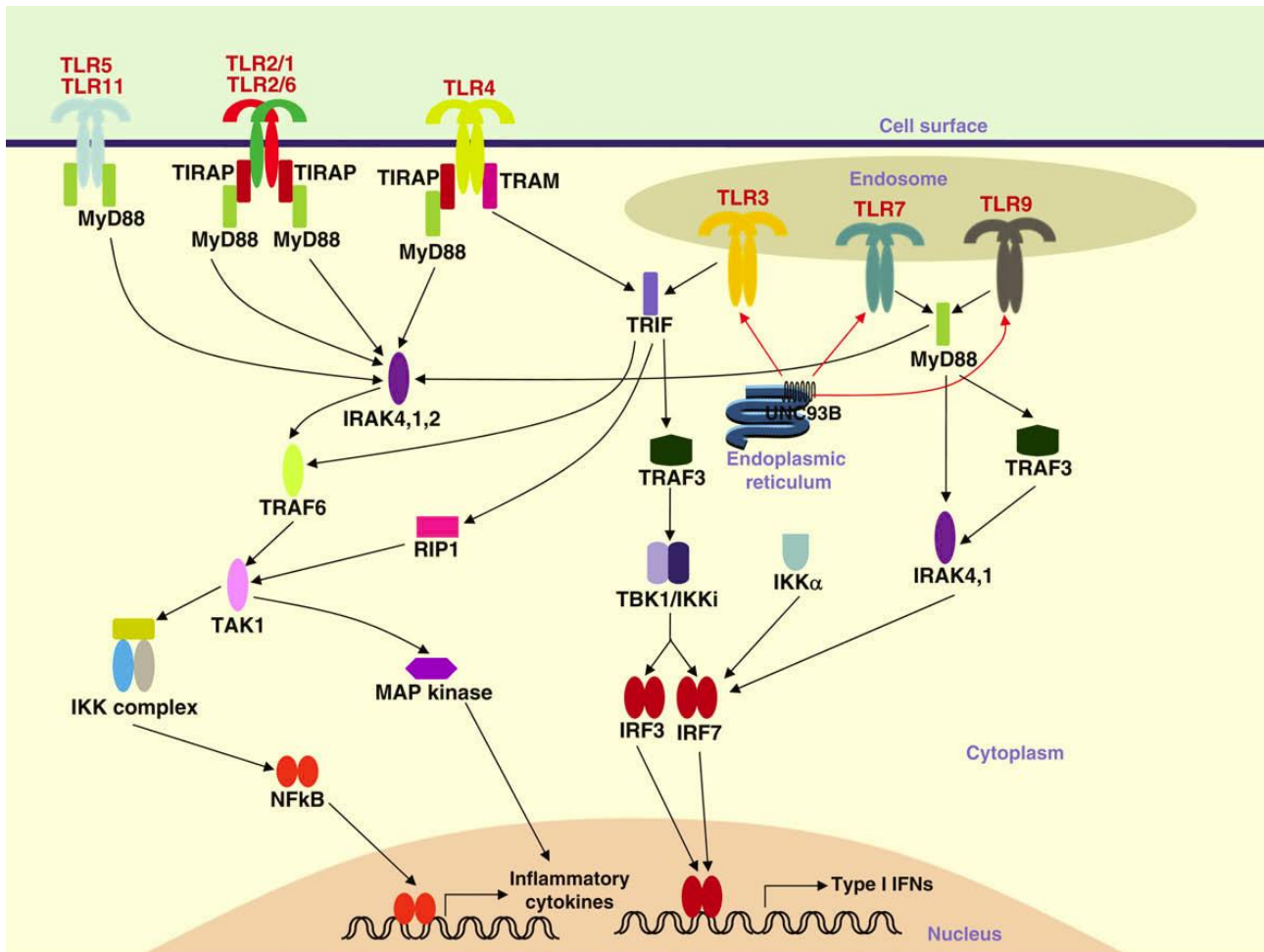
4.2 Rakenne ja signalointimekanismi

TLR:t ovat tyypin I kalvoglykoproteiineja, jotka koostuvat kolmesta osasta (kuva 1) (Kumar ym. 2009b). Solunulkoiselle osalle ovat tyypillisiä toistuvat leusiinia sisältävät aminohappojaksot eli LRR:t (engl. *leucine-rich repeats*). Transmembraanialue kiinnittää reseptorin solumembraaniin. Solunsisäistä osaa kutsutaan reseptorin TIR-alueeksi (engl. *Toll/Interleukin-1 Receptor domain*), ja se on välttämätön solunsisäisen signalointimekanismin aktivoimiseksi. TLR2 muodostaa heterodimeerejä TLR1:n ja TLR6:n kanssa, kun taas muut TLR:t muodostavat homodimeerejä. Reseptori dimerisoituu, kun ligandi sitoutuu siihen.



Kuva 1. TLR:n rakenne (Jin ym. 2007). Kuvassa TLR1/2-dimeeri, johon on kiinnittynyt ligandi Pam₃Cys₄ (D). A. Solunulkoinen osa. B. Solumembraani. C. TIR-alue.

Ligandin sitoutuminen aktivoi signaalitien, jonka keskeisessä osassa on adaptoriproteiini (Kumar ym. 2009b). TLR-signalointi voidaan jakaa MyD88-välitteiseen (engl. *myeloid differentiation primary response gene*) ja TRIF-välitteiseen (engl. *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-β*) signalointiin (kuva 2). Wang (2008) kollegoineen toteaa, että TLR1, TLR2, TLR5, TLR7 ja TLR9 käyttävät ainoana adapterimolekyylinään MyD88:aa, kun taas Kumarin (2009b) työryhmän mukaan ainoastaan TLR5, TLR7, TLR9 ja TLR11 (ei ihmisellä) käyttävät yksinomaan MyD88:aa. Molempien mukaan TLR3 käyttää kuitenkin vain TRIF:iä. TLR1, TLR2 ja TLR6 tarvitsevat lisäksi TIRAP-proteiinin (engl. *TIR domain containing adaptor protein*) reseptorin TIR-osan ja MyD88:n väliin (Kumar ym. 2009b). TLR4 käyttää sekä TIRAP-välitteistä MyD88-signaloitua että TRAM-välitteistä (engl. *TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β-related adaptor molecule*) TRIF-signaloitua. Molemmat mekanismit käynnistävät kaskadimaisen fosforylaatioiden ketjun, joka johtaa lopulta joko NF-κB:n (engl. *nuclear factor-kappa-B*), MAPK:n (engl. *mitogen-activated protein kinase*) tai IRF:n (engl. *interferon regulatory factor*) aktivoitumiseen. Nämä aktivoituneet transkriptiotekijät kulkevat solun tumaan ja saavat aikaan tulehdusreaktiota stimuloivia sytokiineja säätelevien geenien ekspressoitumisen (NFκB:n, MAPK) tai tyypin 1 interferoneja säätelevien geenien ekspressoitumisen (IRF3, IRF7).



Kuva 2. TLR-signalointimekanismit pääpiirteissään (Kumar ym. 2009a). Kuvasta puuttuvat TLR8 (endosomaalinen reseptori kuten TLR3, TLR7 ja TLR9) sekä TLR10 (solukalvoreseptori), joka on ihmisellä toimimaton. (Kuvassa on esitetty myös TLR11, jota ei ole ihmisellä.)

4.3 Ligandit

TLR:iä ja niiden ligandeja on tutkittu paljon. Solukalvon TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 ja TLR6 ovat erikoistuneet tunnistamaan lähinnä bakteerirakenteita, kun taas solunsisäiset TLR3, TLR7, TLR8 ja TLR9 tunnistavat lähinnä viruksia ja nukleiinihappoja (Iwasaki ja Medzhitov 2004). Kaikki TLR-ligandit eivät kuitenkaan ole elimistön ulkopuolelta tulevia patogeeneja, vaan TLR:t tunnistavat myös endogeenisia proteiineja, joita syntyy muun muassa kudonsvaurioiden yhteydessä (Iwasaki ja Medzhitov 2004). Tällaisia endogeenisia molekyylejä ovat esimerkiksi lämpösokkiproteiinit. Tärkeimpiä TLR:ien ligandeja on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. TLR-reseptorien ligandeja ja niiden alkuperiä (koottu Kumar ym. 2009a, Kumar ym. 2009b, Zähringer 2008, Gay ja Gangloff 2007, Akira ja Takeda 2004).

RESEPTORI	LIGANDI	LIGANDIN ALKUPERÄ
TLR1*	Triasyylilipopeptidit (esim. Pam ₃ CSK ₄)*	Bakteerit, mykobakteerit
TLR2	Lipoproteiinit (esim. FSL-1) Lipopeptidit (esim. MALP, Pam ₃ CSK ₄) Peptidoglykaani Lipoteikkohappo Lipomannaani Lipoarabinomannaani Glykoinositolifosfolipidit Glykolipidit Poriinit Atyyppinen lipopolysakkaridi Tsymosaani** Kokonaiset virukset Kokonaiset bakteerit HKLM (Heat-killed <i>L. monocytogenes</i>) Bleomysiini Hyaluronaani	(Synteettinen yhdiste) Useat patogeenit Grampositiiviset bakteerit Grampositiiviset bakteerit <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Mykobakteerit <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> Mm. <i>Leptospira interrogans</i> Sienet Mm. <i>Herpes simplex</i> Mm. <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>Streptomyces verticillus</i> (Endogeeninen molekyyli)
TLR3	Yksi- ja kaksijuosteinen RNA Polyinosiini-polysytidyylhappo	Reovirus, RSV, WNV, EMCV (Synteettinen dsRNA-analogi)
TLR4	Lipopolysakkaridi Taksoli Fuusioproteiini Vaippaproteiini Mannaani Glykoinositolifosfolipidit Lämpösokkiproteiinit 60 ja 70 Fibrinogeeni Hyaluronihapon oligosakkaridit β-defensiini Fibronektiinin solunulkoinen osa A Flavolipiini ER-112022, E5564, E5531 Heparaanisulfaatin polysakkaridifragmentit	Gramnegatiiviset bakteerit Kasvit RSV-virus RSV- ja MMTV-virus <i>Candida</i> <i>Trypanosoma</i> (Endogeenisiä molekyyliä) (Endogeeninen molekyyli) (Endogeenisiä molekyyliä) (Endogeeninen molekyyli) (Endogeeninen molekyyli) <i>Flavobacterium meningosepticum</i> (synteettisiä yhdisteitä) (Endogeenisiä molekyyliä)
TLR5	Flagelliini	Bakteerit
TLR6*	Diasyylilipopeptidit* Lipoteikkohappo Tsymosaani	<i>Mycoplasma</i> Grampositiiviset bakteerit Sienet
TLR7	Imidatsokinoliinit (resikimodi, imikimodi, loksoribiini) Bropirimiini Yksijuosteinen RNA Guanosiinianalogit	(Synteettisiä yhdisteitä) (Synteettinen yhdiste) Virukset (Synteettisiä yhdisteitä)
TLR8	Imidatsokinoliinit Yksijuosteinen RNA Resikimodi	(Synteettisiä yhdisteitä) Virukset (Synteettinen yhdiste)
TLR9	Metyloimattoman CpG-jakson sisältävä yksijuosteinen DNA Hemotsoiini Kromatiini-IgG-kompleksit	Bakteerit ja virukset <i>Plasmodium</i> (Endogeenisiä yhdisteitä)
TLR10	(ei määritetty)	(ei määritetty)
TLR11	Profilliinin kaltainen molekyyli <i>Eschericia coli</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>

* Heterodimeerin muodostus TLR2:n kanssa välttämätöntä ligandin tunnistamiselle.

** Tunnistaminen yhdessä dektiini-1-reseptorin kanssa.

Rakenteellisesti laajimman joukon muodostavat TLR2-ligandit (Zähringer ym. 2008). TLR2 aktivoituu näistä ligandeista fysiologisilla konsentraatioilla (pmol/l) kuitenkin ainoastaan lipoproteiinien ja lipopeptidien vaikutuksesta. On siis mahdollista, että muiden väitettyjen TLR2-ligandien useissa tutkimuksissa todettu aktiivisuus johtuukin todellisuudessa siitä, että testatut näytteet ovat kontaminoituneet lipoproteiineilla ja/tai -peptideillä. Toisaalta TLR2:n ligandien moninaisuus selittyy sillä, että se pystyy tunnistamaan ligandeja yhdessä TLR1:n ja TLR6:n kanssa muodostaen heterodimeerejä (Kumar ym. 2009b). On myös joitakin ligandeja, joiden tunnistamisessa TLR2 joutuu toimimaan yhteistyössä muiden rakenteellisesti erilaisten PRR:ien kanssa. Tällainen on esimerkiksi sienten rakennekomponentti tsymosaani, jonka tunnistamiseen TLR2 tarvitsee C-tyypin lektiiniperheeseen kuuluvan dektiini-1-reseptorin. TLR voi tarvita ligandia sitoessaan avukseen kofaktorin kuten esimerkiksi CD14-proteiinin, jota ilman ligandi ei pysty sitoutumaan TLR1/2-heterodimeeriin tai TLR4:ään (van Duin ja Shaw 2007).

Solun tuottama sytokiiniivaste ei riipu pelkästään TLR:n alatyypistä tai siihen sitoutuvasta ligandista (Iwasaki ja Medzhitov 2004). Myös solutyyppi vaikuttaa sytokiinituotantoon. Esimerkiksi pDC- ja mDC-solutyypit ilmentävät molemmat TLR7:ää, mutta niiden stimulointi synteettisillä TLR7-ligandeilla saa aikaan pDC:issä IFN- α :n tuotannon, kun taas mDC:t alkavat tuottaa IL-12:ta.

4.4 Merkitys immuunivasteiden kehityksessä

Epiteeli-, endoteeli- ja hematopoieettisten solujen kyky tunnistaa PAMP:eja on olennainen osa synnynnäistä immunitettia (Iwasaki ja Medzhitov 2004). Ilman TLR-aktivaatiota elimistö ei reagoi taudinaiheuttajaan välittömästi, mikä voi olla kohtalokasta. TLR:illä on välillistä ja välitöntä antimikrobista vaikutusta (Medzhitov 2007). TLR:n tunnistessa PAMP:n syntyy tulehdusvaste, jossa verenkierron valkosoluja siirtyy verisuonista tulehtuneeseen kudokseen. Aktivoitunut TLR saa aikaan solun (esimerkiksi makrofagin) aktivoitumisen ja sytokiinituotannon (Medzhitov 2007). Pääasiallisia sytokiineja ovat TNF, IL-1 β ja IL-6, joista kaksi ensimmäistä lisäävät verisuonten läpäisevyyttä, mikä puolestaan helpottaa valkosolujen siirtymistä verenkierrosta kudoksiin. Tätä tapahtumaa ohjaavat kemokiinit sekä solupinnan adheesiomolekyylit kuten selektiini (Iwasaki ja Medzhitov 2004). TLR-aktivaatio saa aikaan solujen kemokiinien ja kemokiinireseptorien sekä endoteelisolujen selektiinin tuotannon. Lisäksi kemokiinireseptorien desensitisaatio estyy

TLR:n aktivoitumisen vaikutuksesta. Pääasiallisia TLR-aktivaation seurauksena soluissa syntyviä kemokiineja ovat IL-8, GRO- α , MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1 α , MIP-1 β ja RANTES. Kemokiinit sitoutuvat verisuonten seinämän luminaalipinnalle ja aktivoivat leukosyyttien solukalvon integriiniproteiineja, jotka kiinnittävät ne endoteeliin ja mahdollistavat niiden siirtymisen endoteelisolujen välistä infektoituneeseen kudokseen. TLR-aktivaation välitön antimikrobinen vaikutus välittyy keratinosyyttien D-vitamiinituotannon kautta (Liu ym. 2006). Antimikrobista CAMP:ia (engl. *cathelicidin antimicrobial peptide*) koodaavan geenin indusoituminen on D-vitamiinireseptorista riippuvaista. Keratinosyytin TLR:n aktivoituessa solu lisää sekä D-vitamiinihydroksylaasin että D-vitamiinireseptoreiden tuotantoa, mikä johtaa lisääntyneeseen CAMP:n määrään solussa.

TLR:illä on merkitystä myös dendriittisolujen toiminnassa (Iwasaki ja Medzhitov 2004). Antigeenien fagosytointi, kostimulatoristen ja MHC-molekyylien tuotannon lisääminen, kemokiinituotanto ja antigeenien esittely hankitun immunitetin soluille olisi mahdotonta ilman TLR-aktivaatiota. Kaikista PRR:ista nimenomaan TLR:t ovat avainasemassa erityisesti Th1-, CTL- ja B-soluvasteiden synnyttämisessä. TLR-ligandit aktivoivat siis hankitun immunitetin soluja lähinnä dendriittisolujen välityksellä. Dendriittisolut esittelevät antigeenejä T-soluille, ja Th-solut puolestaan B-soluille, jotka alkavat tuottaa vasta-aineita antigeeniä vastaan. B-solu pystyy kuitenkin tunnistamaan joitakin ligandeja myös suoraan ilman Th-soluja omilla TLR- ja B-solureseptoreillaan (Medzhitov 2007). Tällaisia antigeeneja kutsutaan T-riippumattomiksi ligandeiksi.

TLR3-, TLR4-, TLR7- ja TLR9-aktivaatio laukaisee solun tuottamaan tyypin I interferoneja (Iwasaki ja Medzhitov 2004). Interferonit ovat pääasiallisesti antiviraalisia sytokiineja, mutta niitä tarvitaan myös muisti-T-solujen proliferaation edistämiseen sekä T-solujen apoptoosin estoon. Ne voivat myös aktivoida suoraan CD4⁺-soluja tuottamaan IFN- γ :aa. Lisäksi tyypin I interferonit mahdollistavat B-solujen vasta-ainetyypin vaihdoksen sekä erilaistumisen plasmasoluiksi aktivoimalla dendriittisoluja. Niitä tarvitaan myös NK-solujen aktivoitumiseen ja dendriittisolujen kypsymiseen. Myös CD8⁺-solujen vasteiden ja kemokiinituotannon voimistaminen kuuluvat tyypin I interferonien fysiologisiin vaikutuksiin (Uematsu ja Akira 2007).

Toll-like-reseptorien merkityksestä immuniteetin kannalta kertoo myös se, että niiden puutteellisella toiminnalla on todettu olevan yhteyksiä joidenkin sairauksien syntyyn (ks. myös luku 6). Joidenkin TLR-geenien polymorfioiden on havaittu lisäävän muun muassa eturauhassyövän riskiä (Sun ym. 2005), ja esimerkiksi mutaation TLR3:a koodaavassa geenissä on havaittu altistavan herpesviruksen aiheuttamalle enkefaliitille (Zhang ym. 2007). Myös mutaatiot TLR-aktivaation käynnistämisen solunsisäisen signalointiketjun proteiineja koodaavissa geeneissä voivat altistaa joillekin infektioille. Virheet MyD88-proteiinia koodaavassa geenissä tekevät TLR:ien signalointimekanismin toimimattomaksi (lukuun ottamatta TLR3:a) ja altistavat pyrogeenisten *Streptococcus pneumoniae* - ja *Staphylococcus aureus* -bakteerien aiheuttamille infektioille erityisesti lapsuudessa, kun taas virheellinen IRAK4-proteiini altistaa pneumokokki-infektioille (Bustamante ym. 2008). IRAK:ia koodaavan geenin sekvenssivariantit lisäävät eturauhassyövän riskiä (Xu J ym. 2005).

lällä on havaittu olevan vaikutusta TLR-välitteisten immuunivasteiden voimakkuuteen. Vertaileva tutkimus nuorten ja iäkkäiden TLR:ien toiminnasta ja ilmentymisestä monosyyttien solukalvolla paljasti, että TLR1/2-signalointi oli merkittävästi huonompaa yli 65-vuotiailla kuin 21–30-vuotiailla ja johti vaimeampaan immuunivasteeseen (van Duin ym. 2007). Työryhmä arveli tämän johtuvan lähinnä TLR1:n ilmentymisen huomattavasta vähentymisestä iäkkäämmillä koehenkilöillä. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin TLR:ien indusoimien kostimulatoristen molekyylien ilmentymisen olevan iäkkäillä merkittävästi vähäisempää. lällä voidaan siis katsoa olevan vaikutusta alttiuteen joillekin mikrobi-infektioille.

Vaikka TLR:t ovat tärkeitä immuunipuolustuksen aktivoinnissa, niiden liiallinen toiminta on vahingollista elimistölle (Lang ja Mansell 2007). Tästä syystä TLR:ien toiminnalle on olemassa säätelymekanismeja, jotka hillitsevät TLR-välitteistä tulehdusvastetta. TLR-signalointia hillitsevät solunulkoiset liukoiset TLR:t, jotka toimivat ikään kuin houkutuslintuina ja kilpailevat TLR-agonisteista varsinaisten TLR:ien kanssa välittämättä kuitenkaan signaalia eteenpäin. Myös solukalvossa on säätelytekijöitä, jotka estävät ligandien kiinnittymistä reseptoriin tai eristävät adaptorimolekyylejä katkaisten näin TLR:ien signalointiketjun. Tällaisia ovat muun muassa ST2 (engl. *suppressor of tumorigenicity 2*) ja SIGIRR (engl. *single immunoglobulin IL-1-related protein*). Myös solunsisäisiä säätelymekanismeja on lukuisia. Esimerkiksi SOCS-1 (engl. *suppressor of*

cytokine signalling-1) aiheuttaa negatiivisen palautevaikutuksen sytokiinisignaloinnissa. Sytokiinituotantoon vähentävästi vaikuttavat myös PI3K-proteiinit (engl. *phosphatidylinositol 3'-kinases*) sekä SHP-2 (engl. *SH-2 containing protein tyrosine phosphatase-2*).

TLR:t osallistuvat todennäköisesti useiden autoimmuunisairauksien, kroonisten tulehdusten ja infektiosairauksien syntyyn (van Duin ym. 2007). TLR-aktivaatiolla on havaittu olevan osuutta muun muassa astmassa, nivelreumassa, COPD:ssa, kroonisessa suolistotulehduksessa, diabeteksessa, kardiomyopatiassa, lupuksessa ja ateroskleroosissa (ks. myös luku 6). Joitakin TLR-agonisteja käytetään terapeuttisesti (Zidek ym. 2009). Esimerkiksi synteettisiä metyloimattoman sytosiini–guanosiinijakson sisältäviä oligodeoksinukleotideja (CpG ODN) on käytetty muun muassa hepatiitti B:n ja C:n, astman, allergian ja vaikeasti paranevien kasvainten hoidossa sekä joissakin rokotteissa adjuvanttina (Krieg 2006). Niiden teho perustuu TLR9-aktivaation synnyttämään voimakkaaseen IFN- α - ja β -vasteeseen. TLR7- ja TLR8-agonisteista imidatsokinoliinijohdannaiset imikimodi ja resikimodi ovat myös osoittautuneet käyttökelpoisiksi lääkkeiksi. Ne saavat aikaan IFN- α :n ja - γ :n sekä useiden muiden sytokiinien ja kemokiinien tuotannon. Imikimodia on käytetty jo vuosia muun muassa genitaalialueen syylien hoitoon. Guanosiinianalogit, kuten 7-tio-8-oksoguanosiini, ovat TLR7-agonisteja ja stimuloivat tyypin I interferonien lisäksi IFN- γ :n, IL-6:n, IL-12:n ja TNF:n tuotantoa.

4.5 TLR:ien tutkimusmenetelmät

TLR:iä voidaan tutkia kvantitatiivisesti, kvalitatiivisesti ja funktionaalisesti. *Kvantitatiivisissa* tutkimuksissa yhden tai useamman TLR:n määrä tietyssä solutyypissä pyritään selvittämään sopivalla menetelmällä, kun taas *kvalitatiivisen* tutkimuksen tavoitteena on erityisesti TLR:ien alatyypien suhteellisten osuuksien määrittäminen. *Funktionaaliset* eli toiminnalliset tutkimukset puolestaan selvittävät TLR:ien toimintaa ja aktivoitumisen aikaansaamia vasteita eri solutyypeissä eri ligandien läsnä ollessa. Funktionaalisissa tutkimuksissa yhtä tai useampaa solutyyppiä tai kokoverta stimuloidaan TLR-agonisteilla, jolloin saadaan kullekin solulle, TLR:lle ja ligandille tyypillinen sytokiinivaste. Usein TLR:iin keskittyvät tutkimukset yhdistävät näitä tutkimusmenetelmiä: Ensiksi määritetään valitun solutyypin TLR:ien ilmentämisprofiili, josta selviävät sekä TLR:ien alatyypit että niiden

suhteelliset määrät solussa. Saatujen tietojen valossa valitaan sopivat ligandit, joilla soluja stimuloidaan tuottamaan sytokiineja. Näiden sytokiinien tyyppi ja määrä mittaamalla saadaan tietoa TLR:ien toiminnallisista ominaisuuksista.

TLR:ien kvantitatiiviseen tutkimukseen yleisimmin käytetty menetelmä on *RT-PCR*, jolla pystytään mittaamaan mRNA:ta solusta (tarkempi kuvaus ks. luku 3.5.2). Esimerkiksi McCurdyn (2003), Caronin (2005) ja Rozisin (2008) työryhmät käyttivät RT-PCR:ää selvittäessään osana tutkimuksiaan eri TLR:ien ilmentymistä ihmisen syöttö-, CD4⁺-, LC- ja dendriittisolussa. Useimmat tutkimukset, joissa on keskitytty erityisesti dendriittisolujen TLR-profiiliin, ovat käyttäneet RT-PCR:ää (Iwasaki ja Medzhitov 2004). Reaaliaikainen RT-PCR on kvantitatiivisista menetelmistä herkin ja tarkin. Lisäksi se on nopea ja sillä voi kvantifioida useamman TLR:n mRNA:n samanaikaisesti. Menetelmä vaatii kuitenkin kaikkien parametrien huolellisen optimoinnin, jotta sillä saadaan luotettavia tuloksia.

TLR:ien määrää soluissa voidaan mitata myös proteiinitason menetelmillä. Muun muassa Schmittin (2008) työryhmä käytti *Western blottingia* TLR2:n, TLR4:n ja TLR9:n määrittämiseen monosyyteistä johdetuista dendriittisoluista (moDC). Western blottingissa proteiinit, jotka ensiksi erotellaan polypeptidiketjun pituuden ja kolmiulotteisen rakenteen perusteella geelielektroforeesilla, siirretään nitroselluloosa- tai PVDF-kalvolle, josta ne pystytään detektoimaan spesifisiä väri- tai fluoresenssileimattuja vasta-aineita käyttäen (Zellner ym. 2008).

Myös kvalitatiivisissa tutkimuksissa TLR:ien ilmentyminen voidaan selvittää eri menetelmillä. Selvästi yleisin valkosolujen TLR-ekspression selvittämiseen käytetty menetelmä on kuitenkin *virtaussytometria*, jonka avulla pystytään erottelemaan erikokoisten partikkeleiden fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia niiden valon sironnan ja fluoresenssin perusteella (Bergquist ym. 2009). Esimerkiksi Józsefin (2006) tutkimusryhmä selvitti osana tutkimustaan TLR9:n ilmentymistä neutrofiileissa käyttäen TLR9-vasta-aineita sekä FACScan-virtaussytometriä (engl. *fluorescence-activated cell sorting*), jolla solut pystyttiin lajittelemaan sen mukaan, ilmensivätkö ne TLR9:ää vai eivät. Roelöfsin (2004) työryhmän tutkimuksessa puolestaan selvitettiin TLR3:n ja TLR7:n ilmentymistä nivelreumaa sairastavien potilaiden nivelkalvoissa hyödyntämällä *immunohistokemiallista analyysiä*, jossa käytettiin TLR-spesifisiä vasta-aineita.

Monissa funktionaalisissa tutkimuksissa selvitetään TLR:ien toimintaa, toimintamekanismeja ja stimuloinnin aiheuttamia sytokiinivasteita eri solulinjoissa. Sytokiinivasteita voidaan mitata useilla eri menetelmillä (ks. luku 3.5), joista eniten käytetty on ELISA. Se on tarkka ja herkkä sytokiinien mittaustapa, jonka tulokset ovat hyvin kvantitatiivisia ja toistettavia. Sitä on saatavilla useiden eri valmistajien valmiina kaupallisina pakkauksina (Leng ym. 2008). ELISA:n käytöstä on pitkä kokemus, ja siitä on tullut vähitellen eräänlainen standardimenetelmä solujen sytokiinituotannon mittaamisessa. Sen suorituskyky on kuitenkin pitkälti riippuvainen käytettävän testipakkauksen vasta-aineiden laadusta ja valmistajasta. Menetelmä vaatii suhteellisen suuren, vähintään 200 mikrolitran (Lash ym. 2006) näytetilavuuden, ja sillä voidaan mitata vain yhtä sytokiinia kerralla (Leng ym. 2008). Tästä syystä etenkin useamman sytokiinin mittaaminen tulee kalliiksi. Lisäksi ELISA:n käyttäjällä tarvitsee olla taitoa ja kokemusta, jotta mittaus antaa luotettavan tuloksen.

5 SOLUJEN SYTOKIINIVASTEISIIN VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ

TLR-ligandien aiheuttamat vasteet vaihtelevat iän ja sukupuolen mukaan. Myös jotkin muut yksittäiset tekijät, kuten vuodenaika, kehon nestetasapaino ja hiilidioksidin osapaine veressä, voivat vaikuttaa TLR-vasteisiin. Levyn työryhmä (2004) tutki ELISA:a hyväksi käyttäen vastasyntyneiden monosyyttien TNF- α -vastetta TLR2-, TLR4-, TLR7- ja TLR8-ligandeille *in vitro*. Työryhmä havaitsi, että vastasyntyneiden vasteet lähes kaikille TLR-ligandeille olivat aikuisten vasteita heikommat. Krumbiegel työryhmineen (2007) vertaili *in vitro* -tutkimuksessaan vastasyntyneiden ja aikuisten monosyyteistä johdettujen dendriittisolujen sytokiinivasteita TLR3-, TLR4- ja TLR8-ligandeille ELISA:n lisäksi myös CBA:lla. Tutkimuksessa selvisi, että solujen altistus yksittäisille TLR-ligandeille johti vasteeseen vain aikuisilla, kun taas vastasyntyneillä tarvittiin useamman TLR:n samanaikainen stimulaatio. Nämä tutkimukset selittävät osittain sitä, miksi vastasyntyneiden alttius sairastua tarttuviin tauteihin on aikuisia suurempi.

Myös iäkkäiden ihmisten lisääntyneitä infektiotalttiutta on selitetty tavallista heikommilla TLR-välitteisillä sytokiinivasteilla. van Duinin työryhmän (2007) *in vitro* -tutkimus selvitti TLR1/2-, TLR2/6-, TLR4-, TLR5-, TLR7- ja TLR8-välitteisen TNF- α :n ja IL-6:n tuotannon eroavaisuuksia 21–30- ja yli 65-vuotiaiden PBMC-soluissa. Työryhmä totesi, että TLR1/2-välitteinen TNF- α :n tuotanto ja TLR1/2- ja TLR7/8-välitteinen IL-6:n tuotanto oli yli 65-

vuotiailla merkittävästi heikompaa. Työryhmä arveli tämän johtuvan ainakin osittain TLR1:n vähentyneestä ekspressiosta yli 65-vuotiaiden PBMC-soluissa. Tutkimuksen mittausmenetelmänä käytettiin ELISA:n lisäksi virtausmittausta.

Sukupuoli vaikuttaa TLR-välitteisiin vasteisiin, millä voi olla merkitystä joidenkin sairauksien esiintyvyyden eroissa sukupuolten välillä. Berghöferin tutkimusryhmä (2006) vertaili *in vitro* terveiden naisten ja miesten pDC-solujen ELISA:lla mitattuja TNF- α - ja IFN- α -vasteita TLR7- ja TLR9-ligandeille. Tutkimuksessa kävi ilmi, että naisilla TLR7-stimulaatio aiheuttaa suuremman IFN- α -vasteen kuin miehillä. Tulokset viittaavat siihen, että ainakin osittain tästä syystä autoimmuunisairaus SLE (engl. *systemic lupus erythematosus*) on yleisempi naisilla. Lisäksi TLR7-ligandien terapeuttinen käyttö miehillä esimerkiksi HPV-infektioiden hoidossa ei mahdollisesti juuri tästä syystä ole niin tehokasta. Myös van Eijkin työryhmän (2007) *in vivo* -tutkimus osoitti, että naisilla LPS:n indusoimien proinflammatoristen sytokiinien – erityisesti TNF- α :n – tuotanto on runsaampaa kuin miehillä. Tutkimuksen sytokiinimittauksiin käytettiin Luminex-järjestelmää. Tutkimuksessa selvisi myös, että naisilla on enemmän LPS:ää sitovaa proteiinia eli LBP:tä (engl. *LPS-binding protein*), mikä voi osaltaan selittää naisten voimakkaamman inflammatorisen vasteen. Toisaalta Piolin työryhmän (2006) *in vitro* -tutkimus gynekologisten potilaiden monosyyteillä osoitti, että korkeat estradiolipitoisuudet lisäävät LPS:n stimuloimaa IL-1 β -tuotantoa (TaqMan PCR:llä ja ELISA:lla mitattuna).

TLR-stimulaatiotutkimuksissa on otettava huomioon mahdollinen kausittainen vaihtelu sytokiinivasteissa. Myrianthefsin työryhmä (2003) vertaili *in vitro* terveiden vapaaehtoisten TLR4-välitteistä pro- ja anti-inflammatorista sytokiinivastetta keväällä, kesällä, syksyllä ja talvella. Sytokiinipitoisuudet mitattiin ELISA:ta hyväksi käyttäen. Tutkimuksessa selvisi, että proinflammatoristen IL-6:n ja TNF- α :n tuotanto oli vähäisempää syksyllä verrattuna muihin vuodenaikoihin. Anti-inflammatoristen IL-10:n, TNF-RI:n ja TNF-RII:n tuotanto oli puolestaan pienimmillään kesä- ja syyskuussa. Tällä voi olla merkitystä esimerkiksi immuunijärjestelmään kohdistuvien hoitojaksojen suunnittelussa.

6 TLR-TUTKIMUSMENETELMIEN SOVELLUKSIA TERVEYSTUTKIMUKSISSA

6.1 Astma ja allergia

TLR:ien merkitystä ja yhteyttä eri sairauksiin on tutkittu intensiivisesti (ks. liitetaulukko). Erityisen mielenkiinnon kohteena ovat autoimmuunisairaudet, kuten astma ja nivelreuma, sekä allergiat. TLR:ien epäillään liittyvän astman etiologiaan. Kochin työryhmä (2007) havaitsi *in vitro* -tutkimuksessaan, että LPS aiheutti astmaatikoilla pitoisuusriippuvaisesti heikomman Th1-vasteen (mitattu ELISA:lla) kuin terveillä koehenkilöillä. Tutkimusryhmä epäili tämän johtuvan astmaatikkojen CD4⁺-solujen vähäisemmästä TLR4-ekspressiosta. Kaksi vuotta myöhemmin Lunin työryhmän (2009) tutkimus antoi lisää viitteitä siitä, että astmaan liittyy vahva TLR-komponentti. Tutkimuksessa selvisi, että astmaatikkojen PBMC-solujen TLR4- ja TLR5-ekspressio sekä näiden stimuloinnin seurauksena syntyvä TNF- α -, IL-10- ja IL-1 β -vaste (mitattu CBA:lla) oli merkittävästi heikompi kuin terveillä koehenkilöillä. Tämä viittaisi siihen, että astman immunopatologiseen mekanismiin liittyy Th1- ja anti-inflammatoristen sytokiinien vähentynyt tuotanto, joka johtuu pienemmästä TLR4- ja TLR5-ekspressiosta ja aktivaatiosta.

Roposen työryhmä (2009) tutki puolestaan TLR3:n ja TLR7:n toimintaa 14-vuotiailla atoopikoilla ja astmaatikoilla. Tutkimuksessa valkosoluja (PBMC) altistettiin poly(I:C):lle ja imikimodille kuuden tunnin ajan, minkä jälkeen antiviraalisten myksovirusresistenssiproteiini A:n (MxA) ja 2'5'-oligoadenylaattisyntetaasin (OAS) ilmentyminen mitattiin RT-PCR:llä ja IP-10:n ja IL-6:n tuotanto ELISA:lla. Työryhmä havaitsi, että TLR7:n aktivaatio johti astmaatikoilla huomattavasti heikompiin MxA-, OAS- ja IP-10-vasteisiin kontrolleihin verrattuna. Lisäksi IP-10:n pitoisuuksien huomattiin korreloivan negatiivisesti IgE-pitoisuuksien kanssa. Tulokset viittaavat siihen, että astmaatikoilla TLR7 ei toimi kunnolla, mikä lisää alttiutta virusten aiheuttamille hengitystieinfektioille.

Astmaatikkojen PBMC-solujen TLR-ekspressiossa ja sytokiinivasteissa on havaittu olevan selkeitä eroja terveiden soluihin verrattuna. Chunin (2010) tutkimusryhmä vertaili lievästä, keskivaikeasta ja vaikeasta astmasta kärsivien potilaiden ja terveiden koehenkilöiden TLR1-, TLR2-, TLR3-, TLR6- ja TLR9-ekspressiota PBMC-soluissa *in vitro* ja havaitsi, että astmaatikoilla TLR1:n, TLR2:n ja TLR9:n ekspressio on runsaampaa ja TLR6:n ekspressio

vähäisempää kuin terveillä. Tutkimusryhmä myös stimuloi PBMC-soluja TLR1-, TLR2-, TLR4- ja TLR6-ligandeilla vuorokauden ajan ja mittasi solujen sytokiinituotannon ELISA:lla. Vaikeaa astmaa sairastavien TNF- α -tasojen havaittiin olevan merkittävästi korkeampia kuin lievää tai keskivaikeaa astmaa sairastavien ja terveiden koehenkilöiden. Lisäksi tutkimuksessa kävi ilmi, että lievää astmaa sairastaville aloitettu prednisolonihoito lisäsi huomattavasti TLR4-ekspressiota sekä LPS:n indusoimaa TNF- α - ja IFN- γ -tuotantoa. Tutkimusryhmä päätyi siihen lopputulokseen, että TLR-välitteiset tulehdussignaalit vaikuttavat astman kehittymiseen ja vaikeusasteeseen eivätkä vähene pelkällä glukokortikoidihoidolla. Tehokkain hoito astmaatikoille olisikin mahdollisesti TLR-spesifisen antagonistin ja glukokortikoidin yhdistelmähoito.

Allergian yleistyminen on yhdistetty hygienian lisääntymisen aiheuttamaan vähentyneeseen lapsuusiän mikrobialtistukseen, joka viivästyttää immuunijärjestelmän kypsymistä (Tse ja Horner 2008). Karlssonin työryhmä (2002) tutki vastasyntyneiden ja aikuisten kokonaisilla normaaliflooraan kuuluvilla bakteereilla stimuloitujen monosyyttien sytokiinivasteita *in vitro* ELISA:lla. Tutkimuksessa selvisi, että gramnegatiiviset bakteerit saivat aikaan suurimman sytokiinivasteen. Bakteerien stimuloima IL-12:n ja TNF:n tuotanto oli samaa tasoa vastasyntyneillä ja aikuisilla, kun taas IL-6:n tuotanto oli runsaampaa vastasyntyneillä. Tutkimuksen perusteella eri bakteerikannoilla voi olla erilaisia vaikutuksia lapsen immuunijärjestelmän kypsymiselle ja kehitykselle. Schaubin työryhmä (2006) vertaili puolestaan terveiden ja atooppisten äitien vastasyntyneiden lasten peptidoglykaanin (TLR2-ligandi) indusoimia sytokiinivasteita. Tutkimuksessa käytettiin napanuoraverestä eristettyjä mononukleaarisia soluja, ja sytokiinien mittaaminen tehtiin ELISA:lla ja RT-PCR:llä. Työryhmä havaitsi, että äidin atopia vaikuttaa heikentävästi lapsen IL-10-vasteeseen. Tämä viittaa siihen, että näiden lasten immuunivasteet jäävät heikommiksi myös myöhemmissä mikrobeille altistumisissa.

6.2 Muut krooniset sairaudet

TLR:ien ekspressiossa ja toiminnassa on havaittu muutoksia monien kroonisten tulehduksellisten sairauksien yhteydessä. Roelöfsin työryhmä (2005) tutki *in vitro* TLR3:n ja TLR7:n ilmentymistä nivelkalvoissa sekä monosyyteistä johdettujen dendriittisolujen TLR2-, TLR3-, TLR4- ja TLR7/8-välitteistä sytokiinituotantoa nivelreumaa sairastavilla ja terveillä koehenkilöillä. TLR:ien ilmentyminen selvitettiin tutkimuksessa

immunohistokemiallisesti, ja sytokiinimittauksissa käytettiin multipleksointiin perustuvaa Bio-Plex-järjestelmää. Työryhmä totesi, että nivelreumaa sairastavien nivelkalvoissa oli enemmän TLR3:a ja TLR7:ää ja että TLR2:n ja TLR4:n stimulointi aiheutti heillä suuremman TNF- α - ja IL-6-vasteen kuin terveillä koehenkilöillä. Lisäksi reumapotilaiden seerumi- ja nivelnestenäytteiden TLR4-ligandien pitoisuudet olivat terveisiin verrattuna koholla. Tutkimuksen perusteella voidaan olettaa, että TLR:ien aktivoituminen nivelessä osallistuu toleranssin rikkoutumiseen ja nivelreuman puhkeamiseen.

TLR:iä on käytetty apuna autoimmuunisairauksien hoidon tutkimuksessa. Chamorron työryhmä (2009) testasi tutkimuksessaan IL-10:n, deksametasonin ja D₃-vitamiinin avulla tuotettujen tolerogeenisten dendriittisolujen (TDC) sytokiinivasteita TLR1/2-, TLR3-, TLR4- ja TLR5-ligandeille *in vitro*. Kaikki TDC:t tuottivat ELISA:lla mitattuna vain vähän IL-12:ta ja TNF- α :aa mutta runsaasti IL-10:tä. Deksametasonin ja D₃-vitamiinin avulla tuotettujen TDC:iden tolerogeenisuus ja anti-inflammatoriset ominaisuudet osoittautuivat erityisen käyttökelpoisiksi, ja niistä voisikin olla hyötyä autoimmuunisairauksien hoidossa.

Synnynnäisen immunitetin TLR-välitteisillä vasteilla katsotaan voivan olla merkitystä jopa syövän hoidossa. Dudekin työryhmä (2007) tutki *in vivo* ja *in vitro* kehitteillä olevan pienimolekyylisen imidatsokinoliinin, 852A:n (TLR7-agonisti), vaikutusta sytokiinivasteisiin potilailla, joilla oli vaikeasti paraneva kiinteä syöpäkasvain. Sytokiinimittaukset tehtiin ELISA:lla. Tutkimuksessa todettiin, että potilaiden IFN- α -, IL-1Ra- ja IP-10-tuotanto oli runsaampaa, kun 852A:ta annettiin yli 0,6 mg/m²:n annoksella.

Puutteita TLR-välitteisissä sytokiinivasteissa on yhdistetty erilaisiin immuunivajavuustiloihin. Koval'chukin työryhmä (2007) tutki *in vitro* PBMC-solujen TLR4- ja TLR5-stimulaation aiheuttamia sytokiinivasteita potilailla, joilla oli CVID (engl. *common variable immunodeficiency*). Työryhmä käytti mittauksissa ELISA:a ja havaitsi, että CVID-potilaiden TNF- α -vaste oli terveitä koehenkilöitä heikompi. Schmittin työryhmä (2008) ei puolestaan havainnut samaa menetelmää käyttäen *in vitro* -tutkimuksessaan eroja akuuttia myeloidista leukemiaa sairastavien potilaiden ja terveiden koehenkilöiden dendriittisolujen TLR2-, TLR4- ja TLR9-ekspressiossa eikä näiden välittämässä sytokiinivasteissa. Yeganehin työryhmän (2008) tutkimuksessa vertailtiin puolestaan hyper-IgE-syndroomaa (HIES) sairastavien ja terveiden koehenkilöiden PBMC-solujen TLR2- ja TLR4-stimulaation aiheuttamia sytokiinivasteita *in vitro*. Työryhmä käytti

mittauksissa niin ikään ELISA:a ja sai selville, että HIES-potilaiden sytokiinivaste ei ole kontrolleja heikempi ja että suuremmilla TLR-agonistiannoksilla TNF- α :n tuotanto oli terveisiin verrattuna jopa suurempi. Tämä viittaa siihen, että HIES-potilaiden tulehdusvaste mikrobialtistukselle on epätasapainoinen, mikä voi olla merkityksellinen tekijä sairauden puhkeamisessa.

Myös muun muassa sappikirroosin, synnynnäisen agammaglobulinemian ja neurologisten kehityshäiriöiden yhteyttä TLR-välitteisten sytokiinivasteiden poikkeavuuksiin on tutkittu. Tutkimukset ovat antaneet viitteitä siitä, että immuunijärjestelmän epätasapainolla ja näiden sairauksien ja häiriötilojen etiologialla on jonkinlainen yhteys. Lisätutkimuksia kuitenkin tarvitaan.

II KOKEELLINEN OSA

7 TUTKIMUKSEN TAUSTA JA TAVOITTEET

Tämä pro gradu -työ on osa Suomen Akatemian rahoittamaa ja Terveiden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) toteuttamaa KELMI-tutkimushanketta, joka tutkii ympäristömikrobeille varhaislapsuudessa altistumisen vaikutuksia immunologisten solujen toimintaan ja sairastumisriskiin. Tutkimushankkeen päätavoitteena on oppia ymmärtämään paremmin mekanismeja, joilla maatalousympäristön mikrobialtisteet voivat suojata atopialta ja astmalta. Tutkimuksen laboratoriotyöt toteutettiin THL:n Toksikologian laboratoriossa.

Työn kokeellisen osan tavoitteena oli toteuttaa pilottitesti, jossa terveiltä aikuisilta eristettyjä valkosoluja (PBMC) stimuloitiin valikoiduilla TLR-ligandeilla sytokiinituotannon käynnistämiseksi. Stimulaation jälkeen talteen kerätystä supernatantista mitattiin seitsemän eri sytokiinin pitoisuus MSD[®]:n 7-plex-sytokiinimittausmenetelmää käyttäen. Tutkimuksen päätavoitteena oli vertailla pakastettujen ja tuoreiden solujen sytokiinivasteita. Samalla eristetyistä valkosoluista tehtiin myös virtauscytometrinen dendriittisoluanalyysi.

8 TUTKIMUSAINESTO JA MENETELMÄT

8.1 Verinäytteet

Kahdeltatoista terveeltä vapaaehtoiselta (kuusi naista ja kuusi miestä) kerättiin kultakin kaksi 10 ml:n laskimoverinäytettä 10 ml:n BD Vacutainer -putkiin, joissa antikoagulanttina käytettiin etyleenidiamiinitetraetikkahappoa (EDTA). Verinäytteet laimennettiin steriileihin 50 ml:n putkiin käyttäen RPMI 1640 Glutamax -mediumia, joka sisälsi L-glutamiinia ja antibioottia (1 %). Mediumin ja näytteen suhde oli 1:1.

8.2 PBMC-solujen eristys

Veri-mediumseoksesta eristettiin PBMC-solut siten, että 50 ml:n putken pohjalle pipetoitiin 15 ml Ficoll-Paque™ PLUS -liuosta, jonka päälle pipetoitiin 20 ml veri-mediumseosta (1:1). Putken sisältöä sentrifugoitiin (1500 rpm) 30 minuuttia huoneenlämmössä. Erottuneet PBMC-solut pipetoitiin puhtaaseen 50 ml:n putkeen, minkä jälkeen solut pestiin kolmesti RPMI-mediumilla sentrifugointia (1400 rpm, 10 min) apuna käyttäen. Solususpensiosta otettiin 10 µl:n näyte solulaskua varten. Näyte värjättiin Trypan blue -väriliuoksella (1:20) ja solujen määrä laskettiin Bürkerin kammion avulla.

Solususpensio jaettiin kahteen 0,5 ml:n osaan. Toinen näyte prosessoitiin tuoreena, toinen pakastettiin välittömästi lisäämällä 0,5 ml jääkylmää pakastusliuosta (HI-FCS, jossa 15 % dimetyylisulfoksidia (DMSO)) solususpensioputkeen tipoittain ja siirtämällä solu-pakastusliuossuspensio pakastusputkiin (1 ml/putki), jotka jäähdytettiin pakastuslaatikossa -80 celsiusasteeseen ennen nestetyppeen siirtämistä.

8.3 PBMC-solujen stimulointi TLR-ligandeilla

Tuorenäyte suspendoitiin viljelymediumiin (1×10^6 solua/ml) ennen stimulaatiota. Pakastettuina säilytetyt näytteet sulatettiin pitämällä PBMC-putkea vesihauteessa, kunnes jäätä oli vain hieman jäljellä. Tämän jälkeen putken sisältö kaadettiin merkittyyn 10 ml:n putkeen, johon pipetoitiin hitaasti kylmää sulatusmediumia (RPMI Glutamax, jossa 1 % antibioottia) tippa kerrallaan 10 minuutin ajan jatkuvasti putkea sekoittaen. Putken sisältöä sentrifugoitiin (1340 rpm) 7 minuutin ajan, jonka jälkeen solut resuspendoitiin 1 ml:aan

viljelymediumia. Suspensiosta otettiin 10 µl:n näyte solujen laskemista varten. Putkeen lisättiin 6 ml viljelymediumia ja sentrifugointi toistettiin. Tämän jälkeen solut laskettiin ja suspendoitiin viljelymediumiin (1×10^6 solua/ml).

Sytokiinianalyysia varten solususpensiota jaettiin kahdelle 96-kuoppalevyille (250 µl/kuoppa) kuvan 3 mukaisesti. Stimulantteina käytettiin seuraavia TLR-ligandeja (taulukko 3): Pam₃CSK₄ (PAM3) 0,5 µg/ml (TLR1/2); polyinosiini-polysytidyylihapponatrium (PolyIC) 50 µg/ml (TLR3); lipopolysakkaridi (LPS) 10 ng/ml (TLR4); *Streptomyces californicus* (STRE) 2×10^6 kpl/ml (TLR2); *Pseudomonas fluorescens* (PSE) 2×10^6 kpl/ml (TLR2); peptidoglykaani (PPG) 10 µg/ml (TLR2); stafylokokkienterotoksiini B (SEB) 10 ng/ml (TLR2/4). Ligandeista LPS (L2630), SEB (S4881), PPG (7714) ja PolyIC (P0913) oli hankittu Sigma-Aldrichilta sekä Pam₃CSK₄ (tlrl-pms) InvivoGenilta. Mikrobit (PSE ja STRE) olivat Terveystieteiden ja Hyvinvoinnin Laitoksen Ympäristömikrobiologian laboratorion ympäristönäytteestä eristämiä.

	ID1	ID2	ID3	ID4	ID5	ID6
A	C	C	C	C	C	C
B	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS	LPS
C	PAM3	PAM3	PAM3	PAM3	PAM3	PAM3
D	STRE	STRE	STRE	STRE	STRE	STRE
E	PSE	PSE	PSE	PSE	PSE	PSE
F	PPG	PPG	PPG	PPG	PPG	PPG
G	PolyIC	PolyIC	PolyIC	PolyIC	PolyIC	PolyIC
H	SEB	SEB	SEB	SEB	SEB	SEB

Kuva 3. Stimulaatiokokeissa käytettyjen 96-kuoppalevyjen pipetointikartta (C=kontrolli). Riveille A–C ja F–H pipetoitavien stimulanttilaimennosten määrä oli 5 µl, riveille D ja E pipetoitiin 10 µl stimulanttilaimennosta. Kuvan kaavio on koehenkilöiden 1–6 näytteiden kuoppalevystä, koehenkilöiden 7–12 näytteille oli vastaava levy.

Stimulanttien kantaliuoksista tehtiin ensin välilaimennokset laimennosliuosta käyttäen (RPMI-medium, jossa 1 % antibioottia ja antimykootia sekä 20 % FCS Gold-seerumia). Vähäisen solumäärän vuoksi osaa näytteistä pystyttiin stimuloimaan vain osalla stimulanteista. Tästä syystä stimulanteille määriteltiin seuraava prioriteettijärjestys: kontrolli > LPS > PAM3 > STRE > PSE > PPG > PolyIC > SEB. Stimulaatioissa kontrollina käytettiin RPMI-mediumia, ja solujen stimulaatio tehtiin aseptisesti laminaarivirtauskaapissa huoneenlämmössä. Näytteitä inkuboitiin +37 celsiusasteessa 5 %:n CO₂-pitoisuudessa 24 tunnin ajan. Stimulointiajan päätyttyä sytokiininanalyysinäytteitä (96-kuoppalevyjä) sentrifugoitiin (Megafuge 1800 rpm) kymmenen minuutin ajan, minkä jälkeen kustakin kuopasta pipetoitiin 200 µl supernatanttia syväkuoppalevyn kuoppiin. Syväkuoppalevyt säilytettiin -20 celsiusasteessa sytokiinien mittaamisajankohtaan saakka.

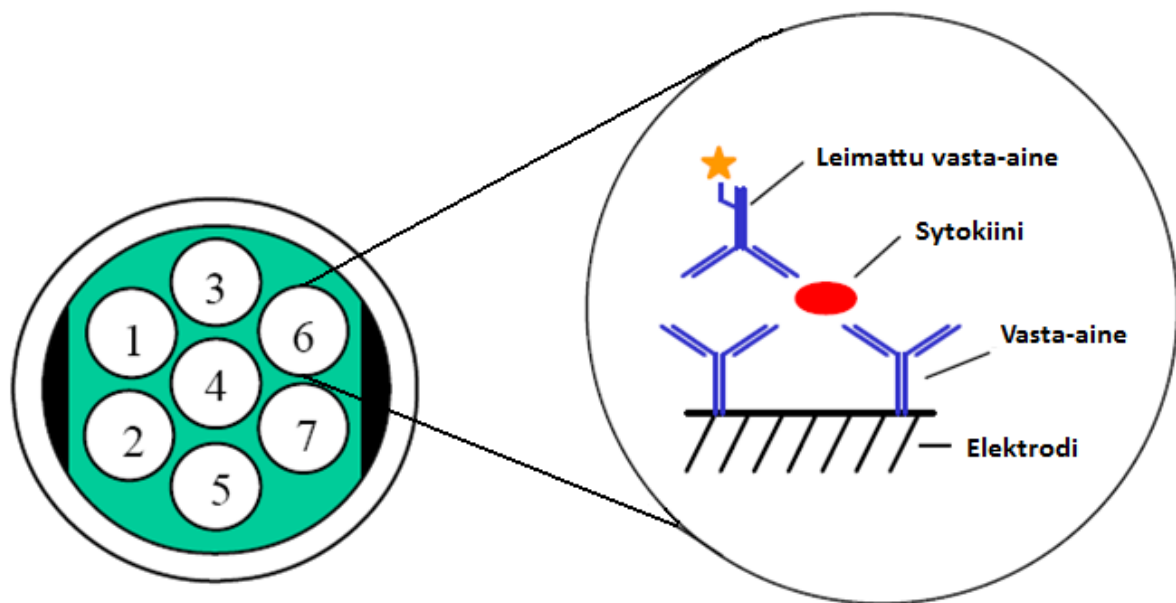
Taulukko 3. Stimulaatiokokeissa käytetyt TLR-ligandit ja niiden lopulliset konsentraatiot.

LIGANDI	TLR	PITOISUUS
LPS	4	10 ng/ml
Pam ₃ CSK ₄	1/2	0,5 µg/ml
STRE	2	2x10 ⁶ kpl/ml
PSE	2	2x10 ⁶ kpl/ml
PPG	2	10 µg/ml
PolyIC	3	50 µg/ml
SEB	2/4	10 ng/ml

8.4 Sytokiinien mittaaminen MSD-laitteistolla

Supernatanteista mitattavia sytokiineja olivat IFN-γ, IL-10, IL-12p70, IL-1β, IL-6, IL-8, ja TNF-α. Mittaamiseen käytettiin Meso Scale Diagnosticsin valmistamaa MSD[®]-sytokiinimittauslaitteistoa ja edellä mainitut seitsemän sytokiinia kattavaa valmista multiplex-alustaa (Human Pro-Inflammatory 7-Plex Assay). Menetelmä perustuu elektrokemiluminesenssiin, jossa SULFO-TAG[™]-leimatut vasta-aineet emittoivat valoa MULTI-SPOT[™]-levyn elektrodipinnoilla tapahtuvan elektrokemiallisen stimulaation seurauksena. Elektrokemiallisen stimulaation saa aikaan sytokiinin sitoutuminen sille spesifiseen vasta-aineeseen täplässä (kuva 4). Menetelmän etuna on se, että

stimulaatiomekanismi ei ole yhteydessä signaalimekanismiin, minkä ansiosta häiritsevä taustasignaali jää hyvin pieneksi.



Kuva 4. Mittauksessa käytetyn multiplex-alustan jokaisessa kaivossa on kullekin mitatulle seitsemälle sytokiinille oma täplä, joka on päällystetty spesifisellä vasta-aineella. Näihin molekyyliin sitoutuvien sytokiinien määrä saadaan selville mittaamalla leimattun vasta-aineen emittoivan valon määrä. (Mukaillen Meso Scale Diagnostics 2010)

Ennen varsinaista mittausta levyn jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 25 μ l Blocker B -liuosta, minkä jälkeen levy suojattiin teippikannella ja sitä inkuboitiin ravistelijassa (300 rpm) yksi tunti huoneenlämmössä. Tämän jälkeen valmistettiin standardisuora (0–10 000 pg/ml) kantaliuoksesta (1 μ g/ml) ja laimennettiin näytteet 1:10 solujen kasvatusliuosta vastaavalla laimennosliuoksella (Diluent 1). Kutakin standardia (rinnakkaisina) ja näytettä (yksittäisinä) pipetoitiin kuoppalevyille 30 μ l, minkä jälkeen kannella suojattua levyä inkuboitiin kaksi tuntia ravistelijassa (300 rpm).

Tämän jälkeen kuoppalevy pestiin kolmesti pesupuskurilla (0,05 % Tween 20 -liuosta fosfaattipuskurisuolaliuoksessa (PBS)), ja detektiovasta-ainekäyttöliuosta (1:50 laimennettu vasta-ainesekoitus Diluent 100 -liuoksessa) pipetoitiin 30 μ l jokaiseen kuoppaan. Kuoppalevyä inkuboitiin kannella suojattuna kahden tunnin ajan ravistelijassa (300 rpm) huoneenlämmössä. Inkubaation jälkeen levy pestiin jälleen kolmesti pesupuskurilla ja Read Buffer -käyttöliuosta pipetoitiin 150 μ l kaikkiin kuoppiin. Tämän jälkeen levy luettiin SECTOR[®] Imagerilla.

8.5 Aineiston analysointi

Data-analyysi tehtiin käyttäen Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 17.0 for Windows) - ja Microsoft® Office Excel 2007 -ohjelmia. Sytokiiniivasteiden muutoksia pidettiin tilastollisesti merkittävänä p-arvon ollessa alle 0,05. Tilastollisena menetelmänä käytettiin Mann-Whitneyn ei-parametrinen U-testiä.

9 TULOKSET

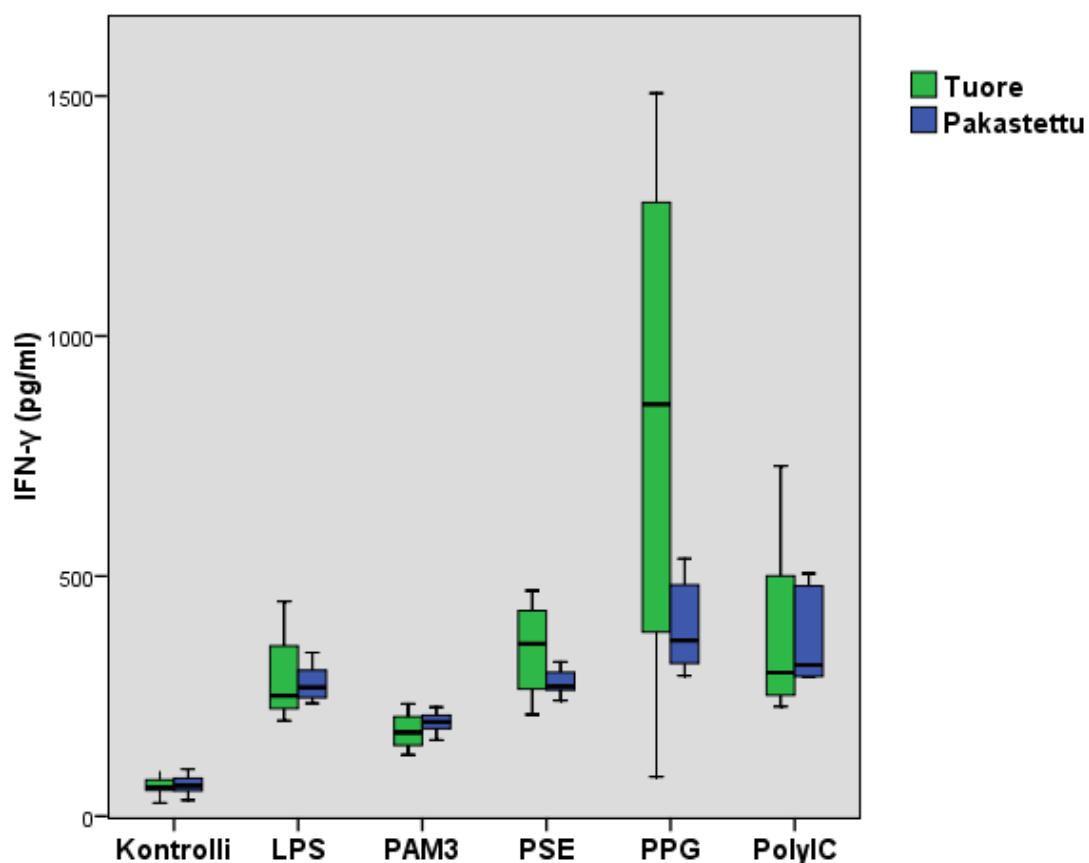
Suurimmassa osassa pakastetuista soluista sytokiiniutuotanto ei ollut määrällisesti merkittävästi erilaista tuoreiden solujen sytokiiniutuotantoon verrattuna (taulukko 4). Erot tuoreiden ja pakastettujen solujen sytokiiniutuotannossa on esitetty kuvissa 5–10, joissa laatikko kuvaa mittausten interkvartaaliväliä (persentiilit 25–75), vaakaviiva mediaania ja hajonta pienintä ja suurinta arvoa alle 1,5 kertaa alle interkvartaalivälin. Merkitsevyystaso $p < 0,05$ on merkitty yhdellä tähdellä, $p < 0,01$ kahdella tähdellä. Ääriarvoja ei ole esitetty kuvissa.

Taulukko 4. Solujen sytokiiniutuotannossa tapahtuneet prosentuaaliset muutokset. Pakastettujen solujen sytokiiniutuotanto joko lisääntyi (vihreä) tai väheni (punainen) tuoreisiin soluihin verrattuna. Tilastollisesti merkitsevät muutokset on lihavoitu (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

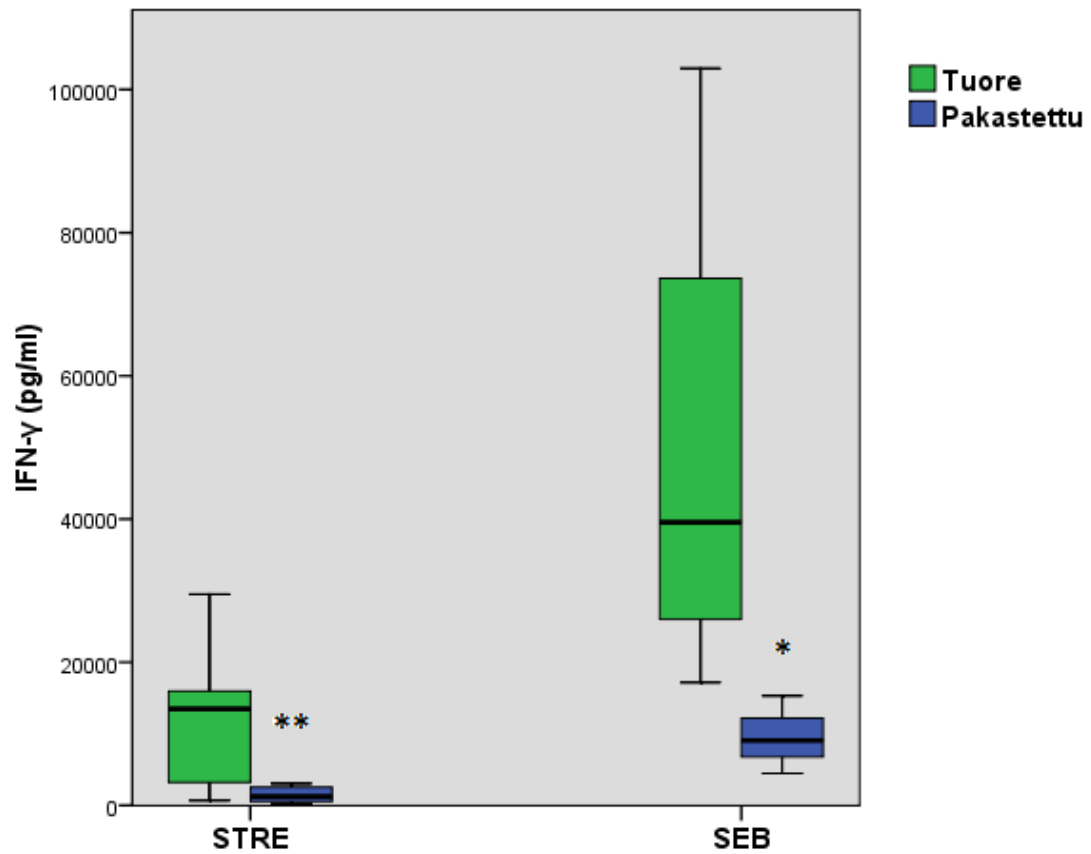
	C	LPS	PAM3	STRE	PSE	PPG	PolyIC	SEB
IFN- γ	+2	+9	+12	-86**	-23	-57	+5	-77*
IL-10	+1	-30	+17	-16*	-37	-59	-27	-64*
IL-12p70	+4	-67**	-2	-36**	-16	-27	-6	-26*
IL-1 β	+21	+182**	+103**	-14	+37	-58*	+173	-86
IL-6	+19	+15	+13	-29*	-19	-43	+19	-81*
TNF- α	+36	+97*	+76*	-45	+65	-33	+115*	-76*

Pakastaminen vaikutti IFN- γ :n ja IL-10:n pitoisuuksia selvästi alentavasti ainoastaan STRE- ja SEB-stimuloiduissa soluissa (kuvat 5a, 5b ja 6). Muiden pakastettujen solujen IFN- γ - ja IL-10-vaste ei poikennut merkittävästi tuoreiden solujen vasteesta. IL-12p70:n määrä oli pakastettujen solujen kohdalla huomattavasti pienempi LPS-, STRE- ja SEB-stimulaatioissa (kuva 7). IL-1 β :n määrä oli puolestaan suurempi pakastetuilla LPS- ja PAM3-soluilla ja pienempi PPG-stimuloiduilla soluilla tuoreisiin verrattuna (kuva 8). IL-6-pitoisuus oli selvästi alhaisempi pakastetuilla kuin tuoreilla STRE- ja SEB-stimuloiduilla soluilla (kuva 9). Pakastettujen solujen TNF- α -vaste oli merkittävästi suurempi LPS-,

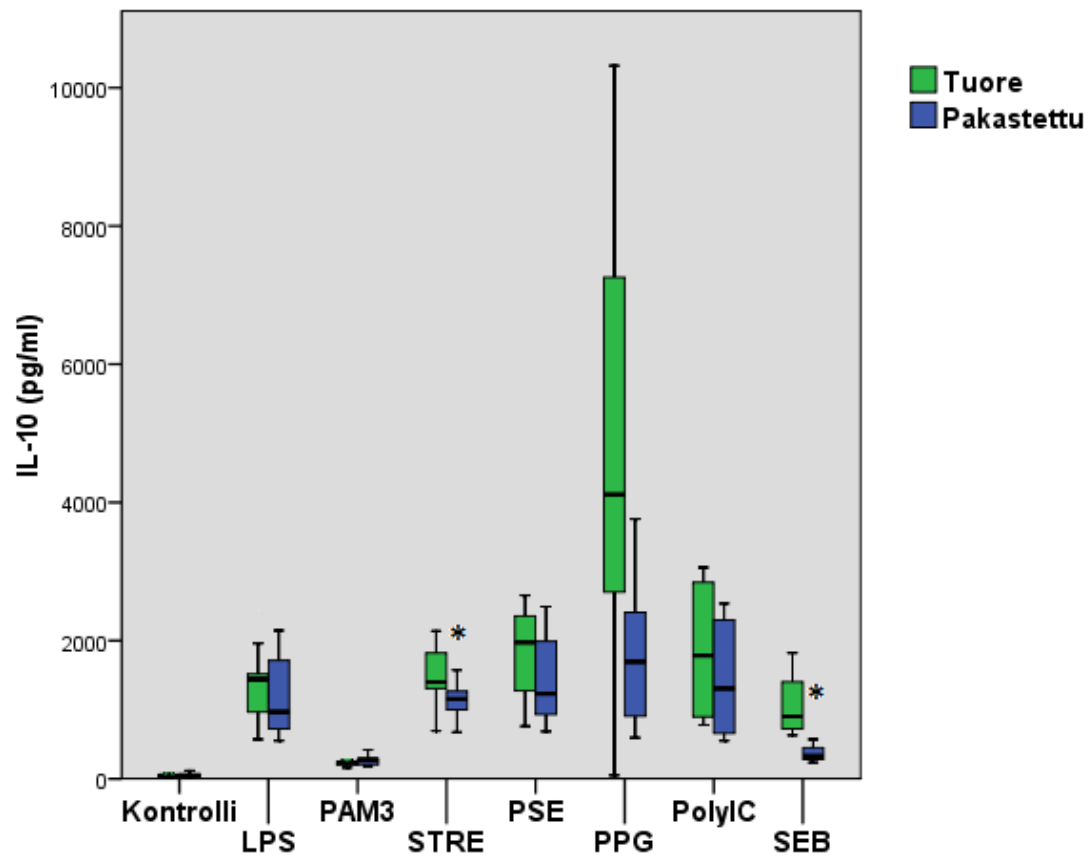
PAM3- ja PolyIC-stimuloiduilla soluilla ja pienempi SEB-stimuloiduilla soluilla (kuvat 10a ja 10b). Pakastamisen vaikutusta IL-8:n pitoisuuksiin ei pystytty luotettavasti arvioimaan, koska IL-8:n tuotanto oli kaikilla stimulaatioilla menetelmän luotettavan määrittäsalueen ylärajalla.



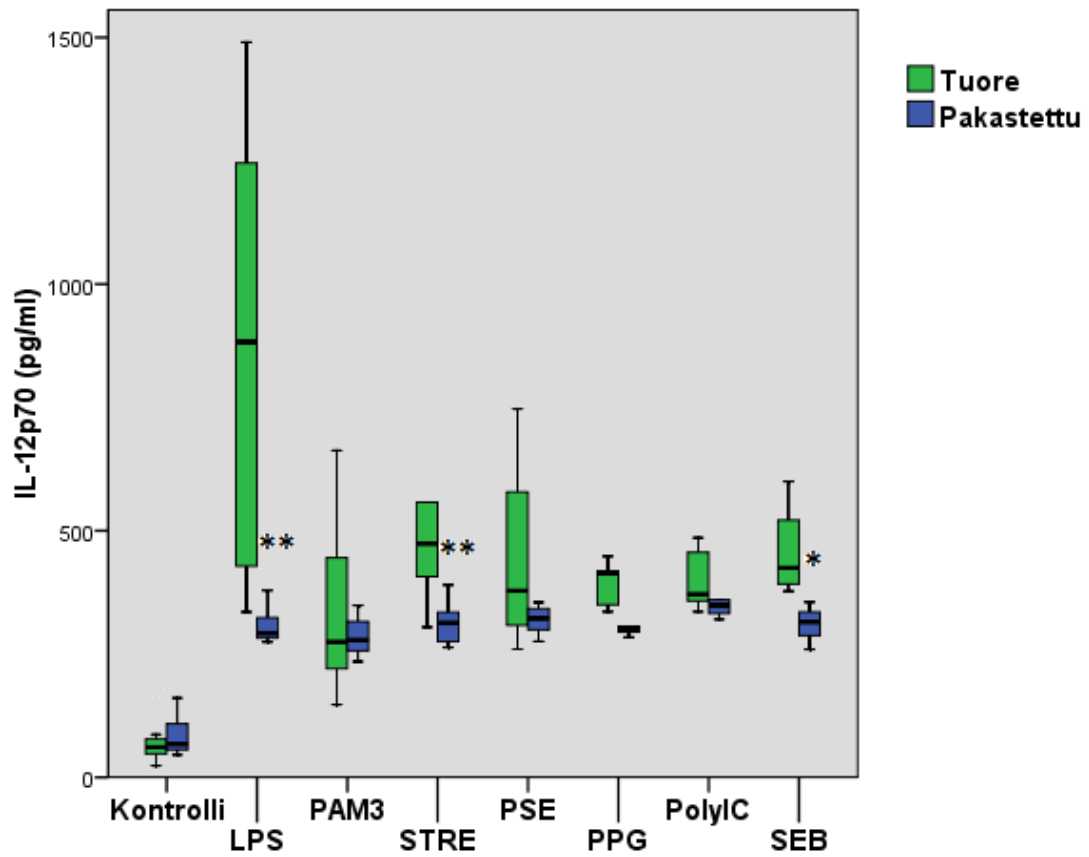
Kuva 5a. LPS:n, PAM3:n, PSE:n, PPG:n ja PolyIC:n vaikutus solujen IFN- γ :n tuotantoon.



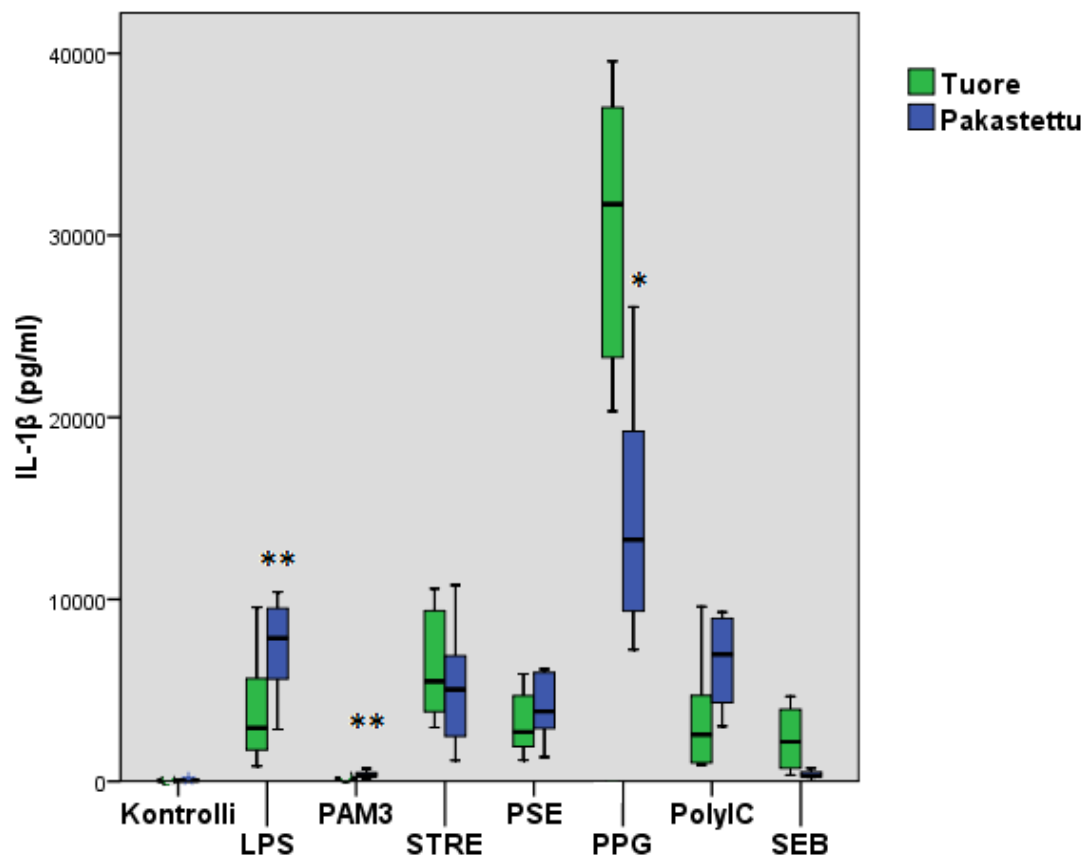
Kuva 5b. STRE:n ja SEB:n vaikutus solujen IFN- γ :n tuotantoon.



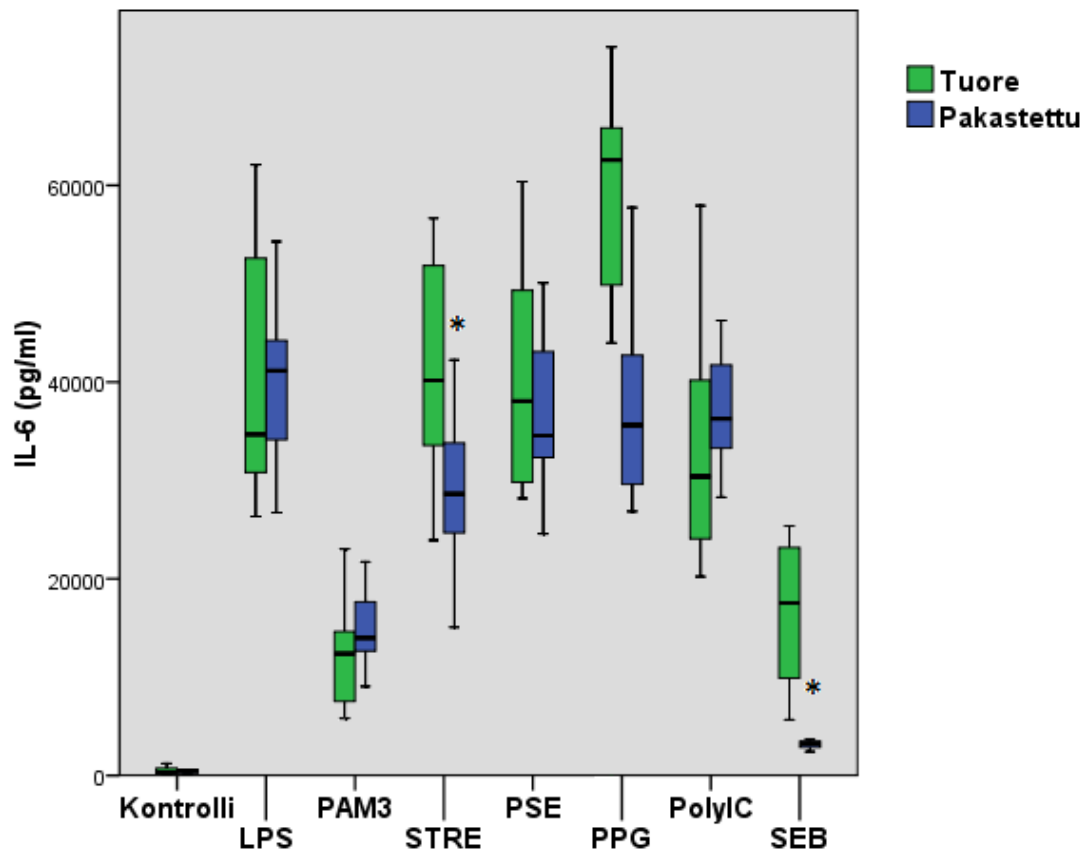
Kuva 6. Stimulanttien vaikutus solujen IL-10:n tuotantoon.



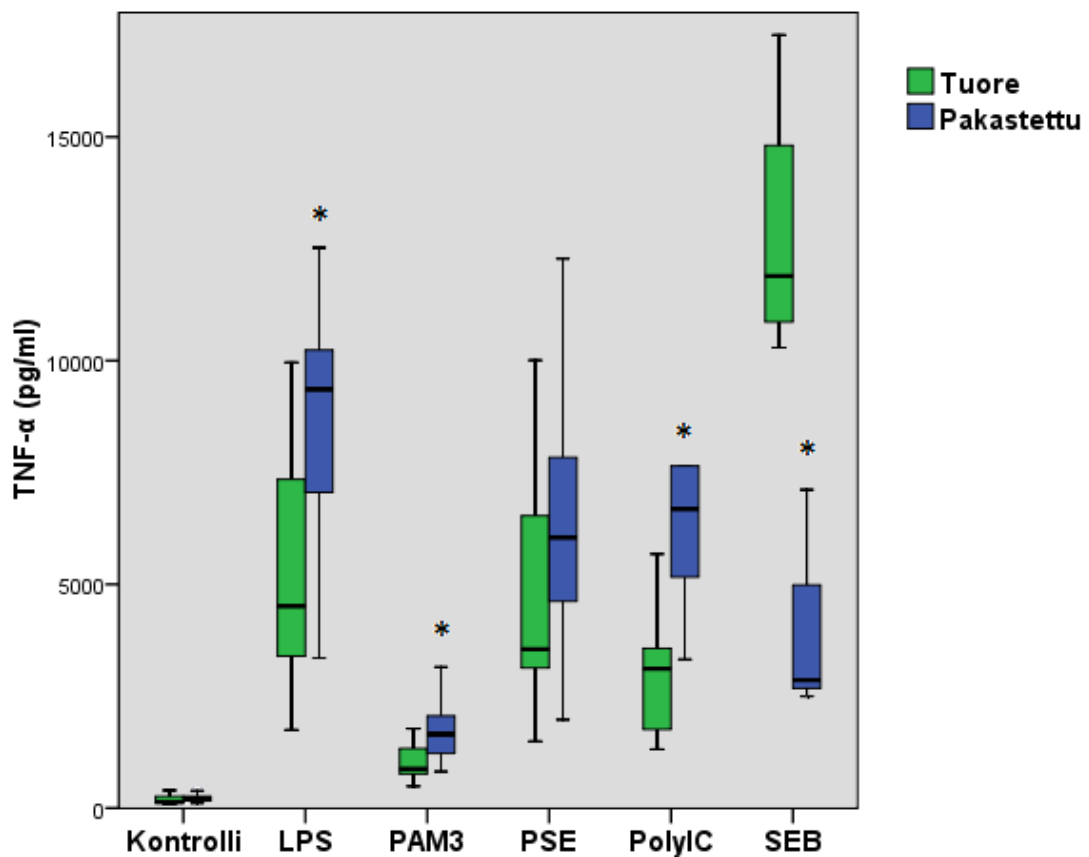
Kuva 7. Stimulanttien vaikutus solujen IL-12p70:n tuotantoon.



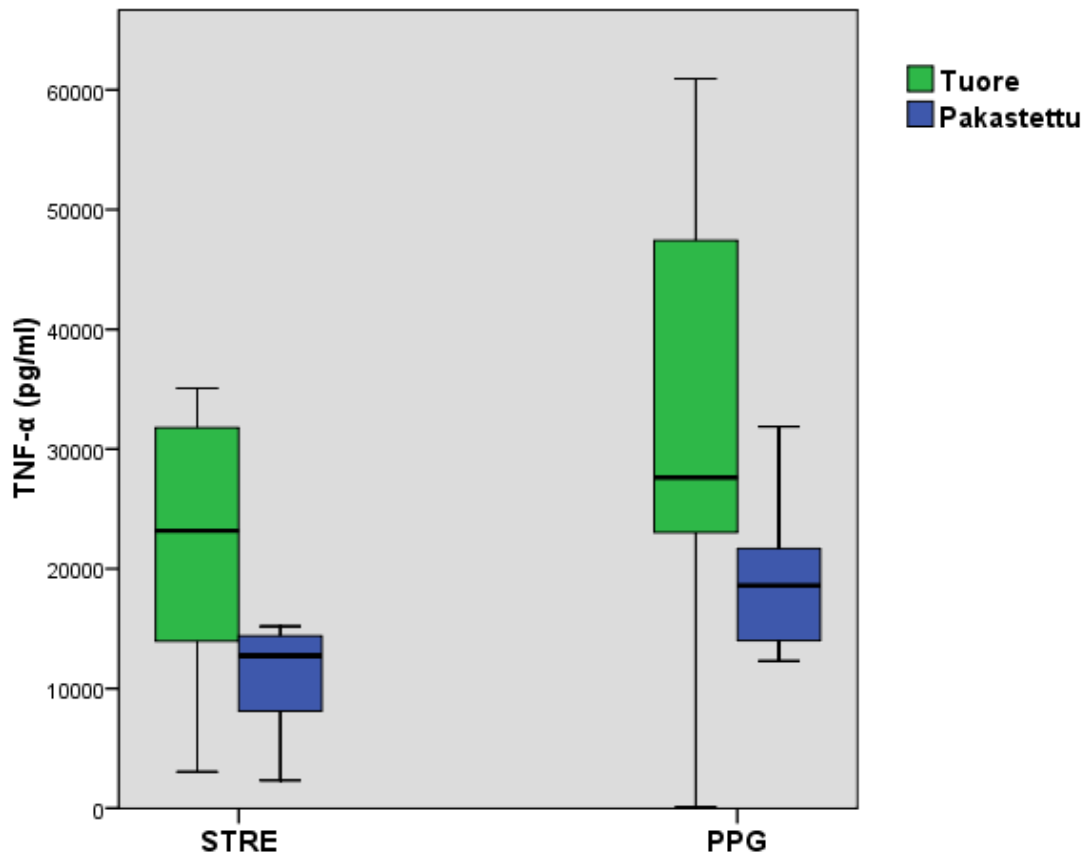
Kuva 8. Stimulanttien vaikutus solujen IL-1β:n tuotantoon.



Kuva 9. Stimulanttien vaikutus solujen IL-6:n tuotantoon.



Kuva 10a. LPS:n, PAM3:n, PSE:n, PolyIC:n ja SEB:n vaikutus solujen TNF-α:n tuotantoon.



Kuva 10b. STRE:n ja PPG:n vaikutus solujen TNF- α :n tuotantoon.

10 POHDINTA

Tässä tutkimuksessa kävi ilmi, että solujen pakastaminen vaikutti *Streptomyces californicus* -bakteerilla stimuloituihin soluihin kaikkien sytokiinien, mutta erityisesti IFN- γ :n, IL-10:n, IL-12p70:n ja IL-6:n, tuotantoa vähentävästi. Lipopeptidi PAM₃CSK₄:llä sekä lipopolysakkaridilla stimuloitujen solujen IL-1 β - ja TNF- α -vaste puolestaan voimistui pakastamisen vaikutuksesta, samoin polyinosiini-polysytidyylihapponatriumilla stimuloitujen solujen TNF- α -vaste. Lipopolysakkaridilla stimuloitujen solujen IL-12p70:n tuotanto oli vähäisempää pakastetuilla soluilla. Peptidoglykaanilla stimoiduissa soluissa pakastaminen näytti vähentävän kaikkien sytokiinien tuotantoa, mutta se näkyi merkittävimmin vähentyneenä IL-1 β -tuotantona.

Verinäytteistä eristettyjen PBMC-solujen määrä vaihteli jonkin verran. Tämä johtuu todennäköisesti sekä yksilöllisestä vaihtelusta että solujen eristysvaiheessa tapahtuneesta solukadosta. Vähäisestä solumäärästä johtuen kaikkia näytteitä ei voitu stimuloida kaikilla

stimulanteilla, koska joissakin näytteissä soluja oli liian vähän. Stimulanttien priorisointijärjestestyksen mukaisesti luotettavimpina voidaan pitää LPS:llä, PAM3:lla ja STRE:llä stimuloitujen solujen sytokiinivasteista saatuja tuloksia, koska niiden havaintomäärä oli suurin (tuoreilla soluilla $n=12$, pakastetuilla $n=11$). Sen sijaan PPG:n ja PolyIC:n kohdalla havaintoja oli vähemmän (tuoreilla ja pakastetuilla soluilla $n=6$), SEB:n kohdalla vähiten (tuoreilla soluilla $n=4$, pakastetuilla $n=3$). Tästä syystä viimeksi mainituilla stimulanteilla saadut tulokset ovat lähinnä viitteellisiä.

Solujen stimuloimisella aikaan saatuun sytokiinivasteeseen ja sen mittaamiseen sisältyy useita mahdollisia virhelähteitä. Solususpension pitoisuus pyrittiin säätämään laimentamalla miljoonaa soluun millilitraa kohden, ja epätarkkuudet tässä prosessissa ovat voineet aiheuttaa sen, että suspensio on sisältänyt enemmän tai vähemmän soluja kuin oli tarkoitus, jolloin myös kokonaissytokiinivaste on muuttunut samassa suhteessa. Lisäksi solususpension homogeenisuus on voinut vaihdella pipetoimisvaiheessa, jos suspensiota ei ole sekoitettu riittävästi kuoppiin pipetointien välillä.

Stimulanttien pipetointi kuoppalevyille on toinen merkittävä mahdollinen virhelähde. Kaikki stimulaatiot tehtiin aseptisesti laminaarivirtauskaapissa kertakäyttöisiä pipetinkärkiä käyttäen, mutta periaatteessa kuoppien välinen ristikontaminaatio on silti mahdollinen. Mikäli stimulanttia on joutunut esimerkiksi ilmakuplan puhkeamisen seurauksena viereiseen kuoppaan 96-kuoppalevyllä, sytokiinivaste on voinut syntyä osin eri ligandin stimuloimana kuin on ollut tarkoitus. Myös puutteet stimulanttien homogeenisuudessa ovat voineet aiheuttaa virhettä tuloksiin. Erityisesti bakteerisuspensioita piti sekoittaa huolellisesti, jotta jokaiseen kuoppaan tuli sama määrä suspension sisältämiä bakteerisoluja. Pipetointi tehtiin yksi kuoppa kerrallaan, ja koska 96-kuoppalevyn kuopat ovat pieniä ja lähellä toisiaan, myös inhimillinen pipetointivirhe on periaatteessa mahdollinen. Tätä virhelähdettä pyrittiin välttämään laatimalla selkeä työsuunnitelma ja pipetointikartta sekä keskittymällä erityisen tarkasti juuri kyseisten virheiden välttämiseen.

Sytokiinien mittauslaite, jolla tämän tutkimuksen mittaukset tehtiin, voi myös vääristää tuloksia. Elektrokemiluminesenssiin perustuvassa menetelmässä on etuna sen taustasignaalin vähäisyys, joka tekee mitattavasta signaalista hyvin luotettavan. On kuitenkin mahdollista, että erityisen herkkää mittaussarjaa käytettäessä signaali ikään kuin

vuotaa viereisiin täpliin ja kuoppiin. Tässä työssä käytettyjen näytteiden sytokiiniipitoisuudet olivat niin korkeat, että näin pääsi todennäköisesti tapahtumaan.

Vaikka tutkimuksesta saatujen sytokiiniipitoisuuksien absoluuttiset määrät eivät siis pidä mittausteknisistä syistä täysin paikkaansa, tuoreiden ja pakastettujen solujen vasteiden välinen suhde antaa kuitenkin melko luotettavan kuvan pakastamisen vaikutuksista sytokiiniivasteiden syntyyn PBMC-soluissa.

11 YHTEENVETO

PBMC-solujen pakastaminen ennen niiden stimulointia Toll-like-reseptoriligandeilla johtaa muutoksiin solujen sytokiiniivasteissa. Sytokiiniipitoisuudet voivat joko laskea tai kohota riippuen siitä, millä TLR-ligandilla soluja on stimuloitu ja minkä sytokiinin määrää on mitattu.

12 KIRJALLISUUS

Abbas A, Lichtman A, Pillai S: Cellular and molecular immunology, 3-17, 6. painos. Saunders Elsevier, Philadelphia 2007

Barksby H, Lea S, Preshaw P, Taylor J: The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical and Experimental Immunology* 149: 217–225, 2007

Berghöfer B, Frommer T, Haley G, Fink L, Bein G, Hackstein H: TLR7 Ligands Induce Higher IFN- α Production in Females. *The Journal of Immunology* 177: 2088–2096, 2006

Bergquist P, Hardiman E, Ferrari B, Winsley T: Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. *Extremophiles* 13: 389–401, 2009

Blanco P, Palucka A K, Pascual V, Banchereau J: Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Reviews* 19: 41–52, 2008

Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Jouanguy E ym.: Novel primary immunodeficiencies revealed by the investigation of paediatric infectious diseases. *Current Opinion in Immunology* 20: 39–48, 2008

Cao W, Liu YJ: Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 19: 24–30, 2007

Caron G, Duluc D, Frémaux I ym.: Direct Stimulation of Human T Cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 Up-Regulate Proliferation and IFN- γ Production by Memory CD4⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* 175: 1551–1557, 2005

Chamorro S, García-Vallejo J, Unger W ym.: TLR Triggering on Tolerogenic Dendritic Cells Results in TLR2 Up-Regulation and a Reduced Proinflammatory Immune Program. *The Journal of Immunology* 183: 2984–2994, 2009

Choi D, Katakura Y, Matsuda R ym.: Validation of a Method for Predicting the Precision, Limit of Detection and Range of Quantitation in Competitive ELISA. *Analytical Sciences* 23: 215–218, 2007

Chun E, Lee S-H, Lee S-Y ym.: Toll-like Receptor Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Asthmatics; Implications for Asthma Management. *Journal of Clinical Immunology*. Julkaistu elektronisena versiona Internetissä 14.1.2010

Damsgaard C, Lauritzen L, Calder P, Kjær T, Frøkiær H: Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines — A comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes. *Journal of Immunological Methods* 340: 95–101, 2009

de Jager W, Bourcier K, Rijkers G, Prakken B, Seyfert-Margolis V: Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC Immunology* 10: 52, 2009

Decker J: Cytokines. Immunology tutorials. The University of Arizona 2006. Haettu Internetistä 24.9.2009: <http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/Tutorials/cytokines.html>

Diebold S: Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 813–823, 2008

Dorresteyn M, van Eijk L, Netea M, Smits P, van der Hoeven J, Pickkers P: Iso-osmolar prehydration shifts the cytokine response towards a more anti-inflammatory balance in human endotoxemia. *Journal of Endotoxin Research* 11: 277–293, 2005

Doyle S, Jefferies C, Feighery C, O'Neill L: Signaling by Toll-like Receptors 8 and 9 Requires Bruton's Tyrosine Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 36953–36960, 2007

Dudek A, Yunis C, Harrison L ym.: First in Human Phase I Trial of 852A, a Novel Systemic Toll-like Receptor 7 Agonist, to Activate Innate Immune Responses in Patients with Advanced Cancer. *Clinical Cancer Research* 13: 7119–7125, 2007

Enstrom A, Onore C, Van de Water J, Ashwood P: Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity* 24: 64–71, 2010

Eriksson M, Sartono E, Martins C ym.: A comparison of ex vivo cytokine production in venous and capillary blood. *Clinical and Experimental Immunology* 150: 469–476, 2007

Funderburg N, Luciano A, Jiang W, Rodriguez B, Sieg S, Lederman M: Toll-Like Receptor Ligands Induce Human T Cell Activation and Death, a Model for HIV Pathogenesis. *PLoS One* 3: e1915, 2008

Galli S, Nakae S, Tsai M: Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature Immunology* 6: 135–142, 2005

Gautier G, Humbert M, Deauvieau F: A type I interferon autocrine–paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 201: 1435–1446, 2005

Gay N, Gangloff M: Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annual Review of Biochemistry* 76: 141–165, 2007

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C: An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* 25: 386–401, 2001

Goncharova L, Tarakanova A: Why Chemokines are Cytokines while their Receptors are not Cytokine Ones? *Current Medicinal Chemistry* 15: 1297–1304, 2008

Henning L, Azad A, Parsa K, Crowther J, Tridandapani S, Schlesinger L: Pulmonary Surfactant Protein A Regulates TLR Expression and Activity in Human Macrophages. *The Journal of Immunology* 180: 7847–7858, 2008

Horwood N, Page T, McDaid J ym.: Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for TLR2 and TLR4-Induced TNF, but Not IL-6, Production. *The Journal of Immunology* 176: 3635–3641, 2006

Hu Yifang, Smyth G: ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of Immunological Methods* 347: 70–78, 2009

Hänninen A, Vakkila J: Dendriittisolu – immuunivasteen kapellimestari. *Duodecim* 119: 763–772, 2003

Ida J, Shrestha N, Desai S, Pahwa S, Hanekom W, Haslett P: A whole blood assay to assess peripheral blood dendritic cell function in response to Toll-like receptor stimulation. *Journal of Immunological Methods* 310: 86–99, 2006

Iwasaki A, Medzhitov R: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology* 5: 987–995, 2004

Jauzein Françoise: La famille des TLR chez les mammifères. Actualisation Continue des Connaissances des Enseignants en Sciences, 2009. Haettu Internetistä 27.10.2009: <http://acces.inrp.fr/acces/ressources/sante/reponse-immunitaire/comprendre/immuniteinnee/famille-des-tlr-chez-les-mammiferes-1>

Jin M, Kim S, Heo J ym: Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* 130: 1071–1082, 2007

József L, Khreiss T, El Kebir D, Filep J: Activation of TLR-9 Induces IL-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology* 176: 1195–1202, 2006

Kaminski N, Kaplan B, Holsapple M: Toxic responses of the immune system. Kirjassa: Casarett & Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons, 494-494, 7. painos. Toim. Klaassen C, The McGraw-Hill Companies, USA 2008

Karlsson H, Hessel C, Rudin A: Innate Immune Responses of Human Neonatal Cells to Bacteria from the Normal Gastrointestinal Flora. *Infection and Immunity* 70: 6688–6696, 2002

Kimura D, Totapally B, Raszynski A, Ramachandran C, Torbati D: The effects of CO₂ on cytokine concentrations in endotoxin-stimulated human whole blood. *Critical Care Medicine* 36: 2823–2827, 2008

Koch A, Knobloch J, Dammhayn C ym.: Effect of bacterial endotoxin LPS on expression of INF-γ and IL-5 in T-lymphocytes from asthmatics. *Clinical Immunology* 125: 194–204, 2007

Komiya A, Nagase H, Okugawa S ym.: Expression and Function of Toll-Like Receptors in Human Basophils. *International Archives of Allergy and Immunology* 140 (suppl 1): 23–27, 2006

Koval'chuk L, Khoreva M, Varivoda A ym.: Analysis of Toll-Like Receptor-Dependent Production of Proinflammatory Cytokines In Vitro by Human Peripheral Blood Mononuclears of Donors and Patients with Primary Immunodeficiency. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 144: 68–71, 2007

Krieg A: Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature Reviews. Drug Discovery* 5: 471 – 484, 2006

Krumbiegel D, Zepp F, Meyer C: Combined Toll-like receptor agonists synergistically increase production of inflammatory cytokines in human neonatal dendritic cells. *Human Immunology* 68: 813–822, 2007

Kubista M, Andrade J, Bengtsson M ym.: The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95–125, 2006

Kumar H, Kawai T, Akira S: Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 388: 621–625, 2009a

Kumar H, Kawai T, Shizuo A: Pathogen recognition in the innate immune response. *Journal of Biochemistry* 420: 1–16, 2009b

Lang T, Mansell A: The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunology and Cell Biology* 85: 425–434, 2007

Lash G, Scaife P, Innes B ym.: Comparison of three multiplex cytokine analysis systems: Luminex, SearchLight™ and FAST Quant®. *Journal of Immunological Methods*: 309: 205–208, 2006

Leng S, McElhaney J, Walston J, Xie D, Fedarko N, Kuche G: ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research. *Journal of Gerontology: Medical Sciences* 63A: 879–884, 2008

Letsch A, Scheibenbogen C: Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods* 31: 143–149, 2003

Levy O, Zarembek K, Roy R, Cywes C, Godowski P, Wessels M: Selective Impairment of TLR-Mediated Innate Immunity in Human Newborns: Neonatal Blood Plasma Reduces Monocyte TNF- α Induction by Bacterial Lipopeptides, Lipopolysaccharide, and Imiquimod, but Preserves the Response to R-848. *The Journal of Immunology*, 173: 4627–4634, 2004

Liu P, Stenger S, Li H ym: Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science* 311: 1770–1773, 2006

Lun S, Wong C, Ko F, Hui D, Lam C: Expression and Functional Analysis of Toll-Like Receptors of Peripheral Blood Cells in Asthmatic Patients: Implication for Immunopathological Mechanism in Asthma. *Journal of Clinical Immunology* 29: 330–342, 2009

Mao T, Lian Z, Selmi C ym.: Altered Monocyte Responses to Defined TLR Ligands in Patients With Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology* 42: 802–808, 2005

Matsumoto M, Seya T: TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 805–812, 2008

McCurdy J, Olynych T, Maher L, Marshall J: Cutting Edge: Distinct Toll-Like Receptor 2 Activators Selectively Induce Different Classes of Mediator Production from Human Mast Cells. *The Journal of Immunology* 170: 1625–1629, 2003

Medzhitov R: Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819–826, 2007

Meier A, Fisher A, Sidhu H ym.: Rapid loss of dendritic cell and monocyte responses to TLR ligands following venipuncture. *Journal of Immunological Methods* 339: 132–140, 2008

Meierhoff G, Ott P, Lehmann P, Schloot N: Cytokine detection by ELISPOT: relevance for immunological studies in type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 18: 367–380, 2002

Meso Scale Diagnostics: MSD[®] 96-Well MULTI-ARRAY[®] and MULTI-SPOT[®] Human Cytokine Assays. Haettu Internetistä 23.02.2010: <http://www.meso-scale.com/CatalogSystemWeb/Public/CatalogSearch.aspx>

Meyer O: Interferons and autoimmune disorders. *Joint Bone Spine* 76: 464–473, 2009

Myrianthefs P, Karatzas S, Venetsanou K ym.: Seasonal variation in whole blood cytokine production after LPS stimulation in normal individuals. *Cytokine* 24: 286–292, 2003

Napolitani G, Rinaldi A, Berton F, Sallusto F, Lanzavecchia A: Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1–polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology* 6: 769–776, 2005

Oikonen V: Pakastuksen vaikutus leukosyyttien biokemiallisiin toimintoihin. Syventävien opintojen tutkielma, Kemian ja biokemian laitos, Turun yliopisto, 1996

Pala P, Hussell T, Openshaw P: Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *Journal of Immunological Methods* 243: 107–124, 2000

Pettersson T, Karenko L, Ranki A: Sytokiinireseptorin mutaatio jaksoittaisen kuumeoireyhtymän syynä. *Duodecim* 115: 1951–1953, 1999

Pioli P, Weaver L, Schaefer T, Wright J, Wira C, Guyre P: Lipopolysaccharide-Induced IL-1 β Production by Human Uterine Macrophages Up-Regulates Uterine Epithelial Cell Expression of Human β -Defensin 2. *The Journal of Immunology* 176: 6647–6655, 2006

Re F, Strominger J: IL-10 Released by Concomitant TLR2 Stimulation Blocks the Induction of a Subset of Th1 Cytokines That Are Specifically Induced by TLR4 or TLR3 in Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 173: 7548–7555, 2004

Roelöfs M, Joosten A, Abdollahi-Roodsaz S ym.: The Expression of Toll-like Receptors 3 and 7 in Rheumatoid Arthritis Synovium Is Increased and Costimulation of Toll-like Receptors 3, 4, and 7/8 Results in Synergistic Cytokine Production by Dendritic Cells. *Arthritis & Rheumatism* 52: 2313–2322, 2005

Roponen M, Yerkovich S, Hollams E, Sly P, Holt P, Upham J: Toll-like receptor 7 function is reduced in adolescents with asthma. *European Respiratory Journal* 35: 1–8, 2009

Rozis G, Benlahrech A, Duraisingham S, Gotch F, Patterson S: Human Langerhans' cells and dermal-type dendritic cells generated from CD34 stem cells express different toll-like receptors and secrete different cytokines in response to toll-like receptor ligands. *Immunology* 124: 329–338, 2008

Salaun B, Romero P, Lebecque S: Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *European Journal of Immunology* 37: 3311–3318, 2007

Sandor F, Buc M: Toll-like Receptors. II. Distribution and Pathways Involved in TLR Signalling. *Folia Biologica* 51: 188–197, 2005

Sauder C, Pedras-Vasconcelos, Puig M, Verthelyi D: The IP10 (CXCL10) specific cDNA probe of the mCK-5c multiprobe RNase protection assay kit carries two nucleotide insertions that complicate the interpretation of results. *Cytokine* 41: 182–186, 2008

Schaub B, Campo M, He H ym.: Neonatal immune responses to TLR2 stimulation: Influence of maternal atopy on Foxp3 and IL-10 expression. *Respiratory Research* 7: 40, 2006

Schmitt A, Li L, Giannopoulos K, Greiner J ym.: Quantitative expression of Toll-like receptor-2, -4, and -9 in dendritic cells generated from blasts of patients with acute myeloid leukemia. *Transfusion* 48: 861–870, 2008

Silvennoinen O, Hurme M: Uutta sytokiineista. *Duodecim* 119: 773–779, 2003

Sun J, Wiklund F, Zheng L ym.: Sequence variants in Toll-like receptor gene cluster (TLR6-TLR1-TLR10) and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 97: 525–532, 2005

Thompson J, Iwasaki A: Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 786–794, 2008

Trinchieri G, Sher A: Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews. Immunology* 7: 179–190, 2007

Tse Kevin, Horner A: Allergen Tolerance Versus the Allergic March: The Hygiene Hypothesis Revisited. *Current Allergy and Asthma Reports* 8: 475–483, 2008

Uematsu S, Akira S: Toll-like Receptors and Type I Interferons. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 15319–15324, 2007

Valent P, Dahinden C: Role of interleukins in the regulation of basophil development and secretion. *Current Opinion in Hematology* 17: 60–66, 2009

van Duin D, Mohanty S, Thomas V ym.: Age-Associated Defect in Human TLR-1/2 Function. *The Journal of Immunology* 178: 970–975, 2007

van Duin D, Shaw A: Toll-Like Receptors in Older Adults. *Journal of the American Geriatrics Society* 55: 1438–1444, 2007

van Eijk L, Dorresteyn M, Smits P, van der Hoeven J, Netea M, Pickkers P: Gender differences in the innate immune response and vascular reactivity following the administration of endotoxin to human volunteers. *Critical Care Medicine* 35: 1464–1469, 2007

Wang R-F, Miyahara Y, Wang HY: Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene* 27: 181–189, 2008

Xu D, Komai-Koma M, Liew F: Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cellular Immunology* 233: 85–89, 2005

Xu J, Lowey J, Wiklund F ym.: The Interaction of Four Genes in the Inflammation Pathway Significantly Predicts Prostate Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 14: 2563–2568, 2005

Yeganeh M, Henneke P, Rezaei N ym.: Toll-Like Receptor Stimulation Induces Higher TNF- α Secretion in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Hyper IgE Syndrome. *International Archives of Allergy and Immunology* 146: 190–194, 2008

Zellner M, Babeluk R, Diestinger M, Pirchegger P, Skeledzic S, Oehler R: Fluorescence-based Western blotting for quantitation of protein biomarkers in clinical samples. *Electrophoresis* 29: 3621–3627, 2008

Zhang S, Jouanguy E, Ugolini S ym.: TLR3 Deficiency in Patients with Herpes Simplex Encephalitis. *Science* 317: 1522, 2007

Zídek Z, Anzenbacher P, Kmoníčková E: Current status and challenges of cytokine pharmacology. *British Journal of Pharmacology* 157: 342–361, 2009

Zähringer U, Lindner B, Inamura S, Heine H, Alexander C: TLR2 – promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* 213: 205–224, 2008

LIITETAULUKKO

Tutkimus ja sen päälöydös	Koehenkilöt, solujen tuoreus (T=tuore, J=ollut pakastettuna) ja mittauksen aikapisteeet	Sytokiinien mittaamenetelmä	Käytetyt stimulantit (suluissa ilmoitetut kohde-TLR:t)	Käytetyt pitoisuudet/ optimaaliseksi havaittu pitoisuus	Solut ja niiden tutkimuksessa ilmoitettu käsittely ennen altistusta	Mitatut vasteet (sytokiinit)
<u>Berghöfer B et al. (2006): TLR7 Ligands Induce Higher IFN-α Production in Females.</u> Naisilla TLR7-stimulaatio aiheuttaa suuremman IFN- α -vasteen kuin miehillä, mikä saattaa olla syynä SLE:n yleisyyteen juuri naisilla sekä siihen, että TLR7-ligandit terapeuttisessa käytössä miehillä eivät ole niin tehokkaita.	Terveet vapaaehtoiset; T; 20 h	ELISA	R-848 (resikimodi) (TLR7) R-837 (imikimodi) (TLR7) CpG-ODN 2216 (TLR9)	1 μ g/ml 1 μ g/ml 3 μ g/ml	Human PBL ja pDC (eristetty PBMC-soluista): viljely RPMI 1640, jossa L-glutamiinia, penisilliiniä ja streptomysiiniä, 10% lämpöinaktivoitua FCS Goldia, ei-välttämättömiä aminohappoja, natriumpyruvaattia, HEPESiä	TNF- α , IFN- α
<u>Birmachu W et al. (2007): Transcriptional networks in plasmacytoid dendritic cells stimulated with synthetic TLR 7 agonists.</u> pDC:iden stimulointi TLR7-agonisteilla saa aikaan IFN- α :n usean alatyypin sekä IFN- β :n tuotannon \rightarrow TLR7-agonistien käyttö virus- ja tuumorilääkkeinä voisi olla mahdollista.	Terveet vapaaehtoiset; T; 4 h	ELISA; Origen; Human Cytokine 25-Plex Luminex Kit (supernatantti ollut jäädytettynä)	imidatsokinoliinit: 3M-852A (TLR7) 3M-011 (TLR7 ja 8)	5 μ g/ml 5 μ g/ml	pDCs (eristys PBMC-soluista)	IFN- α ; IL-12, TNF- α ; IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40/70, IL-13, IL-15, IL-17, TNF- α , IFN- α , IFN- γ , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, MIG, eotaksiini, RANTES, MCP-1

Chamorro S et al. (2009): <u>TLR Triggering on Tolerogenic Dendritic Cells Results in TLR2 Up-Regulation and a Reduced Proinflammatory Immune Program</u> . TDC:t tuottivat vain vähän IL-12:ta ja TNF- α :aa mutta paljon IL-10:tä. DX-DC:t ja 1,25(OH) ₂ D ₃ -DC:t parhaat solutyypit autoimmuunisairauksien hoidon työkaluiksi (tolerogeenisuus ja anti-inflammatorisuus hyviä).	Terveet vapaaehtoiset; T; 18 h	ELISA (supernatantti säilytetty -80 asteessa)	LPS (TLR4) Pam ₃ CSK ₄ (TLR1 ja 2) flagelliini (TLR5) Poly(I:C) (TLR3)	10 ng/ml 10 μ g/ml 5 μ g/ml 10 μ g/ml	PBMC-solut → monosyyttien eristys → tolerogeenisten dendriittisolujen viljely (TDCs): RPMI 1640 medium + 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 30 g/ml penicillin/streptomycin, IL-4 ja GM-CSF (500 U/ml and 800 U/ml); lisäksi joko IL-10 (10 ng/ml), deksametasoni (1 mikromol/l) tai kalsitrioli (10 nmol/l); sitten pesu ennen stimulaatiota	IL-10, IL-12p40, IL-6, TNF- α
Chun E et al. (2010): <u>Toll-like Receptor Expression on Peripheral Blood Mononuclear Cells in Asthmatics; Implications for Asthma Management</u> . Astmaattikkojen PBMC-soluissa ekspressoituu enemmän TLR:ia 1, 2 ja 9, vähemmän TLR6:ta. Vaikeaa astmaa sairastavilla TNF- α -tasot merkittävästi korkeammat kuin muilla astmaattikoilla ja kontroleilla. Astmaattikoilla, joille prednisolonihoito aloitettiin, TLR4:n ekspressio sekä LPS:n stimuloima TNF- α - ja IFN- γ -tuotanto lisääntyivät merkittävästi. TLR-välitteiset tulehdussignaalit eivät vähene glukokortikoidihoidolla ja vaikuttavat astman kehittymiseen ja vaikeusasteeseen. Paras hoito astmaattikoille olisi ehkä TLR-spesifinen antagonisti ja glukokortikoidi yhdistettynä.	Astmaattikkoja (lääkityksellä tai ilman) ja terveitä vapaaehtoisia; J; 24 h	ELISA (supernatantti säilytetty -80 asteessa)	Pam ₃ Cys (TLR1) peptidoglykaani (TLR2) LPS (TLR4) FSL-1 (TLR6)	1 μ g/ml 10 μ g/ml 1 μ g/ml 0,1 μ g/ml	PBMC-solut, mediumina ja pesuliuksena RPMI 1640	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ

<p><u>Dorresteijn M et al. (2005): Iso-osmolar prehydration shifts the cytokine response towards a more anti-inflammatory balance in human endotoxemia.</u> Esinesteyttämättömän ryhmän proinflammatoriset TNF-α, IL-1β ja IL-8 kohosivat merkittävästi enemmän endotoksiiniannostelun jälkeen kuin esinesteytetyn ryhmän, anti-inflammatorisella puolella (IL-10) ei eroa.</p>	<p>Terveet vapaaehtoiset; (T); 15, 30, 60 ja 90 min sekä 2, 3, 4, 6, 8 ja 22 h</p>	<p>Simultaneous Luminex Assay (supernatantti säilytetty -80 asteessa)</p>	<p>LPS (TLR2 ja 4)</p>	<p>2 ng/kg</p>	<p>(in vivo -tutkimus)</p>	<p>TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10</p>
<p><u>Doyle S et al. (2007): Signaling by Toll-like Receptors 8 and 9 Requires Bruton's Tyrosine Kinase.</u> XLA-potilaiden PBMC-solujen Btk ei toimi, mistä syystä heidän IL-6-vasteensa CpG DNA:lle on huono. Btk on siis tärkeä molekyyli TLR8- ja -9-signaaloinnissa.</p>	<p>XLA-potilaat ja terveet vapaaehtoiset (PBMC); T; 5, 15, 30 ja 60 min</p>	<p>ELISA</p>	<p>CpGB (TLR9) R848 (TLR7 ja 8)</p>	<p>3 μg/ml 1 μg/ml</p>	<p>THP1-solulinja ja PBMC-solut</p>	<p>IL-6</p>
<p><u>Dudek A et al. (2007): First in Human Phase I Trial of 852A, a Novel Systemic Toll-like Receptor 7 Agonist, to Activate Innate Immune Responses in Patients with Advanced Cancer.</u> Potilailla, jotka saivat ko. TLR7-agonistia yli 0,6 mg/m² annoksella, havaittiin IFN-α:n, IL-1RA:n ja IP-10:n nousua; maksimi siedetty annos 1,2 mg/m².</p>	<p>Potilaita, joilla vaikeasti paraneva kiinteä syöpäkasvain, sekä terveitä vapaaehtoisia; (T); 2, 4, 6, 9, 12 ja 24 h</p>	<p>ELISA</p>	<p>imidatsokinoliini 3M-001 (=852A) (TLR7)</p>	<p>0,2 % liuos (i.v.) 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 1.55 ja 2.0 mg/m² (BSA:lla laskettuna); 0,5-1,193 ng/ml</p>	<p>(In vivo -tutkimus); pDC-solujen eristys PBMC-soluista, viljely RPMI 1640:ssa, jossa 10% FCS, 1% penisilliiniä ja streptomysiiniä</p>	<p>IFN-α, IL-1RA, IL-12p40, IP-10; IFN-α</p>

<p>Enstrom A et al. (2009): <u>Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders</u>. ASD-lapsilla IL-1β, IL-6 ja TNF-α korkeammat TLR2-stimulaation jälkeen, lisäksi IL-1β, IL-6, GM-CSF ja TNF-α matalammat TLR9-stimulaation jälkeen → ASD-lasten monosyytit responsiivisempia tietyille TLR-agonisteille.</p>	<p>Terveet lapset ja ASD-lapsipotilaat; T; 24 h</p>	<p>Multiplex Luminex -analyysi (supernatantti ollut jäädytettynä - 80 asteessa 2 kk)</p>	<p>LTA (TLR2) polyIC (TLR3) LPS (TLR4) flagelliini (TLR5) CpG-B (TLR9)</p>	<p>10 μg/ml 50 μg/ml 10 μg/ml 1 μg/ml 2 μmol/l</p>	<p>PBMC-solut → sentrifugointi, plasma pois, solute Hanks' Buffered Salt Solutioniin, sitten Lymphocyte Separation Mediumiin → sentrifugointi, pesu kahdesti HBSS:llä, sitten PBS:ään, jossa 0,5 % BSA. Monosyyttien erotus CD14-magneettileiman avulla, säätö 2x10⁶ soluun/ml, medium RPMI 1640 + 10 % FBS, 100 IU/ml penisilliini ja streptomysiini</p>	<p>IL-1β, IL-6, IL-8, (IL-12p70), TNF-α, MCP-1, GM-CSF</p>
<p>Eriksson M et al. (2007): <u>A comparison of ex vivo cytokine production in venous and capillary blood</u>. Sytokiinipitoisuuksia kapillaari- ja laskimoverinäytteissä ei voi vertailla: TNF-α-pitoisuudet korkeammat kapillaariveressä sekä lapsi- että aikuisryhmässä ei-stimuloiduissa näytteissä, IL-10 aikuisilla korkeampi kapillaarinäytteessä kuin lapsilla, IL-5 ja IFN-γ ei kuitenkaan eroa. LPS-stimuloiduissa näytteissä sekä aikuisilla että lapsilla IL-10 korkeampi kapillaarinäytteessä, TNF-α:ssa ei muutosta. Pam3Cys + PPD → TNF-α ja IL-10 kohosivat enemmän kapillaarinäytteissä. PPD yksin → ei IL-10:n nousua. Aikuisilla PHA-stimulaatio → IL-5 korkeampi laskimonäytteessä.</p>	<p>Terveitä aikuisia sekä lapsia, joista puolet saaneet tuhkarakorokotuksen; T; 24 h (LPS), 72 h (muut)</p>	<p>Immuno-bead based multiplex assays (supernatantti ollut jäädytettynä - 80 asteessa)</p>	<p>LPS (TLR4) PAM₃Cys (TLR2) PHA (TLR2) PPD (TLR2)</p>	<p>1 ng/ml 100 ng/ml 2 μg/ml 10 μg/ml</p>	<p>Heparinisoitu kokoveri: RPMI 1640 medium, jossa 2 mM glutamaattia, 1 mM pyruvaattia, 100 IU penisilliiniä ja 100 μg/ml streptomysiiniä</p>	<p>TNF-α, IL-10, IFN-γ, IL-5</p>

Horwood N et al. (2006): <u>Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for TLR2 and TLR4-Induced TNF, but Not IL-6, Production.</u> Btk-puutos alentaa TLR2-välitteistä TNF-tuotantoa sekä TLR2- ja -4-välitteistä IL-1 β -tuotantoa, mutta ei vaikuta IL-6:n, IL-8:n tai IL-10:n tuotantoon. Vastaavasti Btk:n yliekspressio lisää TLR2-välitteistä TNF-tuotantoa, ei IL-6:n, IL-8:n eikä IL-10:n tuotantoa. Btk on siis tärkeä entsyymi TLR2- ja -4-välitteisessä TNF- ja IL-1 β -tuotannossa.	XLA-potilaat (sairaus johtuu Btk-puutoksesta) ja terveet vapaaehtoiset; T; 4 ja 18 h	ELISA (supernatantti säilytetty -20 asteessa)	LPS (TLR4) Pam ₃ Cys (TLR1 ja 2)	10 ng/ml 100 ng/ml	PBMC-solut ja makrofagit. Viljely RPMI 1640 -mediumissa, jossa 100 U/ml penisilliiniä ja streptomysiiniä sekä 10% FCS	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10
Karimi K et al. (2006): <u>Toll-like receptor-4 mediates cigarette smoke-induced cytokine production by human macrophages.</u> Tupakansavu aiheuttaa TLR4-välitteisen IL-8-tuotannon monosyyteissä ja makrofageissa.	Terveet vapaaehtoiset; T; 5 h	ELISA, CBA (supernatantti säilytetty -20 asteessa)	tupakansavu (LPS kontrollina) (TLR4)	(eri konsentraatioita, ei ilmoitettu)	PBMC-solut → neutrofiilien, monosyyttien ja makrofagien eristys	IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12
Karlsson H et al. (2002): <u>Innate Immune Responses of Human Neonatal Cells to Bacteria from the Normal Gastrointestinal Flora.</u> Bakteerien stimuloima IL-12 ja TNF-tuotanto oli samaa tasoa vastasyntyneiden ja aikuisten soluilla, ja gramnegatiiviset bakteerit aiheuttivat suuremman tuotannon. IL-6:n tuotanto oli vastasyntyneillä runsaampaa. Suoliston bakteerityypillä voi olla merkitystä lapsen immuunijärjestelmän kypsymiselle.	Terveet vapaaehtoiset ja vastasyntyneet (napanuoraverta); T; 24 h	ELISA (supernatantti ollut jäädytetty -20 asteessa)	Grampositiivisia ja -negatiivisia bakteereja (TLR2 ja 4): <i>B. adolescentis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>S. mitis</i> , <i>C. minutissimum</i> , <i>C. perfringens</i> ; <i>B. vulgatus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>V. parvula</i> , <i>N. sicca</i>	5 x 10 ⁷ bakteeria/ml	Monosyyttien eristys kokoverestä, viljely ilman seerumia AIM-V-mediumissa, jossa L-glutamiinia, 50 g/ml streptomysiinisulfaattia, 10 g/ml gentamysiinisulfaattia ja 20 M merkaptotetanolia	IL-12p70, TNF- α , IL-6, IL-10

Karlsson H et al. (2004): <u>Pattern of Cytokine Responses to Gram-Positive and Gram-Negative Commensal Bacteria Is Profoundly Changed when Monocytes Differentiate into Dendritic Cells.</u> Monosyyttien stimulointi <i>L. plantarum</i> illa aiheutti IL-12p70- ja TNF-tuotannon toisin kuin stimulointi gramnegatiivisilla bakteereilla. DC:iden stimulointi gramnegatiivisilla bakteereilla aiheutti IL-12p70:n, TNF:n IL-6:n ja IL-10:n tuotannon, stimulointi grampositiivisilla ei. Grampositiiviset stimuloivat monosyyttejä, gramnegatiiviset DC:itä. Suoliston bakteerien stimuloima sytokiinituotanto vastasyntyneillä on aikuisten kaltainen.	Verenluovuttajat; (T); 24 ja 48 h	ELISA	Grampositiiviset bakteerit <i>L. plantarum</i> , <i>B. adolescentis</i> Gramnegatiiviset bakteerit <i>E. coli</i> , <i>V. parvula</i> LPS (TLR2) PGN (TLR4)	0.5, 5 ja 50 bakteeria/solu	PBMC-solut → monosyyttien eristys → MDDC-solujen ja makrofagien luominen: 1) MDDC:t: RPMI 1640, jossa 5 % AB-seerumia, 1 mM L-glutamiinia, 50 µg/ml gentamysiiniä, 500 U/ml IL-4:ää, 300 U/ml GM-CSF:ää 2) Makrofagit: sama kuin MDDC:illä, mutta vain 1.1 U/ml GM-CSF	IL-12p70, TNF-α, IL-6, IL-10
Kimura D et al. (2007): <u>The effects of CO₂ on cytokine concentrations in endotoxin stimulated human whole blood.</u> Veren CO ₂ -pitoisuus voi vaikuttaa endotoksiinilla stimuloituun pro- ja anti-inflammatoristen sytokiinien tuotantoon: Hyperkapnia alensi TNF-α:n, IL-1β:n, IL-10:n ja IL-6:n pitoisuuksia.	Terveet vapaaehtoiset; T; 24 h	ELISA (supernatantti säilytetty -80 asteessa)	LPS (TLR4)	100 ng/ml	Kokoveri: RPMI 1640 medium, jossa 10 % FBS:ää, 100 U/ml penisilliiniä ja 100 µg/ml streptomysiiniä	TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IFN-γ
Kirschenbaum A et al. (2008): <u>Effect of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN) on human mast cell numbers, cytokine production, and protease composition.</u> LPS voi muuttaa syöttösolujen lukumäärää erityisesti kun SCF-konsentraatio on alhainen, PGN ja LTA vähentävät syöttösolujen lukumäärää. LPS aiheutti IL-1β, IL-6, IL-8 ja IL-12 pitoisuuksien nousun, PGN ei.	Terveet vapaaehtoiset; T; 72 h	Cytometric Bead Array (CBA)	LPS (TLR4) PGN (TLR2) LTA (TLR2)	100 ng/ml 10 µg/ml 0,1-10 µg/ml	Ihmisen syöttösoluja (HuMC): 8 viikon ikäiset HuMC viljelty 100 ng/ml rhSCF:ssa, sitten pesu ja inkubaatio 72 h joko 10 tai 100 ng/ml rhSCF:ssa, jossa joko 100 ng/ml LPS tai 10 µg/ml PGN tai ei kumpaakaan	IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (mitattuna IL-12p70:nä), IFN-γ, SCF ja TNF-α

Koch A et al. (2007): <u>Effect of bacterial endotoxin LPS on expression of INF-γ and IL-5 in T-lymphocytes from asthmatics.</u> Astmaatikolla LPS aiheuttaa pitoisuusriippuvaisesti heikomman Th1-vasteen kuin terveillä, mikä voi johtua pienemmästä TLR4-ekspressiosta astmaatikkojen CD4 ⁺ -soluissa.	Atooppisia astmapotilaita ja terveitä vapaaehtoisia; T; 72 h	ELISA	LPS (TLR4)	10 ng/ml 1 μ g/ml	PB-T-lymfosyytit, viljely RPMI 1640 mediumissa, jossa 10% (v/v) FCS:ää, 2 mM L-glutamiinia, 100 U/ml penisilliiniä ja 100 μ g/ml streptomysiiniä	IL-5 ja IFN- γ
Kolb-Mäurer A et al. (2003): <u>Production of IL-12 and IL-18 in human dendritic cells upon infection by <i>Listeria monocytogenes</i>.</u> Kokonainen bakteeri aiheutti IL-12:n ja IL-18:n tuotannon, LTA IL-18:n muttei IL-12:n tuotantoa; LPS IL-12:n muttei IL-18:n tuotantoa \rightarrow heikennetyt <i>L. monocytogenes</i> -kannat käyttökelpoisia rokotteissa.	Terveet vapaaehtoiset; T; 48 h	ELISA	<i>Listeria monocytogenes</i> (TLR2) LTA (TLR2) LPS (TLR4)	10 MOI 10, 50 ja 100 μ g/ml 1 ja 10 μ g/ml	PBMC-solut, viljely RPMI 1640 mediumissa, jossa 1% autologista humaaniplasmaa, 2mM L-glutamiinia, 1000 U/ml (10 ng/ml) rhIL-4:ää, 800 U/ml (72 ng/ml) rhGM-CSF:ää. DC:iden kypsymiseen IL-6 (1000 U/ml resp. 5 ng/ml), IL-1 β (1000 U/ml resp. 10 ng/ml), TNF- α (1000 U/ml resp. 10 ng/ml), PGE ₂ (10 ⁻⁸ M resp. 1 μ g/ml), listeriabakteerin LTA-fraktioita I and II (10-100 μ g/ml) ja LPS (1-10 μ g/ml) 48 tunnin ajan. Lisäksi villin tyypin <i>L. monocytogenes</i>	TNF- α , IL-12 (p70), IL-18
Koval'chuk L et al. (2007): <u>Analysis of Toll-Like Receptor-Dependent Production of Proinflammatory Cytokines In Vitro by Human Peripheral Blood Mononuclears of Donors and Patients with Primary Immunodeficiency.</u> TLR4- ja -5-stimulaatio (LPS ja flagelliini) tuotti CVID-potilailla heikomman TNF- α -vasteen.	Terveet vapaaehtoiset ja CVID-potilaat; T; 24 h	EIA (supernatantti säilytetty -70 asteessa 2-3 kk)	Polyinosiini-polysytidiini (TLR3) LPS (TLR4) tsymosaani A (TLR2 ja 6) flagelliini (TLR5) CpG ODN (TLR9)	10 μ g/ml 0,1 μ g/ml 10 μ g/ml 0,5 μ g/ml 1 μ g/ml	Mononukleaariset solut, viljely RPMI 1640-mediumissa, jossa 5% FCS:ää, 2 mM L-glutamiinia ja 100 μ g/ml gentamysiiniä. Solutiheys 10 ⁶ solua/ml	TNF- α , IFN- α

Krumbiegel D et al. (2007): <u>Combined Toll-like receptor agonists synergistically increase production of inflammatory cytokines in human neonatal dendritic cells.</u> Vastasyntyneiden DC:ssä IL-12p70-tuotantoa ja naiivi-T-soluissa IFN- γ -tuotantoa yhdistetyn TLR-stimuloinnin jälkeen, mutta huomattavasti aikuista vähemmän → lapsella selvästi huonommat vasteet.	Terveet vapaaehtoiset ja vastasyntyneet (napanuoraverta); T; 24 ja 48 h	ELISA; Human Inflammation Cytometric Bead Array Kit; (supernatantti säilytetty -20 asteessa)	LPS (TLR4) Poly(I:C) (TLR3) R-848 (TLR8) ssRNA (TLR8)	10 μ g/ml 25 μ g/ml 5 μ g/ml 5 μ g/ml	PBMC-solut → pesu, DC-erottelu CD14-ekspression perusteella ja viljely 3 vrk RPMI 1640-mediumissa, jossa 2 mM L-glutamiinia, 100 IU/ml penisilliiniä, 100 g/ml streptomysiiniä, 1 mM natriumpyruvaattia, välttämättömiä aminohappoja, 0.05 mM β -merkaptetanolia, 5% FCS:ää, 100 ng/ml rh-GM-CSF:ää ja 20 ng/ml rh IL-4:ää	IL-12p40; IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α
Levy O et al. (2004): <u>Selective Impairment of TLR-Mediated Innate Immunity in Human Newborns: Neonatal Blood Plasma Reduces Monocyte TNF Induction by Bacterial Lipopeptides, Lipopolysaccharide, and Imiquimod, but Preserves the Response to R-848.</u> Vastasyntyneiden monosyyttien TNF- α -vaste kaikille muille tässä käytetyille TLR-ligandeille paitsi resikimodille oli selvästi heikempi kuin aikuisten.	Terveet vapaaehtoiset; T; 5 h	ELISA	Bakteerilipopeptidit Pam ₃ -CSSNA ja MALP (TLR2) LPS (TLR4) imikimodi (TLR7) resikimodi (TLR8)	1 ja 10 μ g/ml 1 ja 10 μ g/ml 1 ja 10 μ g/ml 1 ja 10 μ g/ml	PBMC-solut → monosyyttien eristys	TNF- α
Lun S et al. (2009): <u>Expression and Functional Analysis of Toll-Like Receptors of Peripheral Blood Cells in Asthmatic Patients: Implication for Immunopathological Mechanism in Asthma.</u> Astmaatikkoilla sekä TLR4- ja 5-ekspressio että niiden stimuloinnin seurauksena saatu TNF- α -, IL-10- ja IL-1 β -tuotanto oli huomattavasti vähäisempää kuin terveillä, mikä saattaa olla osasyynä astman syntyyn.	Astmapotilaita ja terveitä vapaaehtoisia; T; 24 h	Cytometric Bead Array (CBA)	PGN (TLR2) LPS (TLR4) Poly(I:C) (TLR3) flagelliini (TLR5) imikimodi (TLR7) ssRNA (TLR8)	1 μ g/ml 1 μ g/ml 1 μ g/ml 1 μ g/ml 1 μ g/ml 0,5 μ g/ml)	PBMC-solut	TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6, IL-12

Mao T et al. (2005): <u>Altered Monocyte Responses to Defined TLR Ligands in Patients With Primary Biliary Cirrhosis.</u> PBC-potilaiden monosyytit tuottivat stimulaation jälkeen enemmän IL-1 β :aa, IL-6:ta, IL-8:aa ja TNF- α :aa.	Vapaaehtoisia potilaita, joilla primäärinen sappikirroosi; T; 24 h	Cytokine Bead Assay (CBA) (supernatantti säilytetty -20 asteessa)	LTA (TLR2) PolyIC (TLR3) LPS (TLR4) flagelliini (TLR5) CpG-B (TLR9)	10 μ g/ml 50 μ g/ml 100 μ g/ml 1 μ g/ml 2 μ mol/l	PBMC-solut \rightarrow sentrifugointi ja pesu suolaliuksella, jossa 0,5 % naudan seerumin albumiinia ja 0,05 % EDTA:ta. Monosyyttien eristys positiivisen ja negatiivisen valinnan avulla. RPMI 1640-medium, jossa 10 % FBS:ää, penisilliiniä 50 U/ml, streptomysiiniä 50 μ g/ml. 96-kuoppalevyllä 100 μ l/kaivo	(IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, TNF- α
Myrianthefts P et al. (2003): <u>Seasonal variation in whole blood cytokine production after LPS stimulation in normal individuals.</u> Proinflammatoristen IL-6:n ja TNF- α :n tuotanto on pienempää syksyllä (syyskuussa) muihin vuodenaikoihin verrattuna, anti-inflammatoristen IL-10:n, TNF-RI:n ja TNF-RII:n tuotanto on puolestaan pienempää kesä- ja syyskuussa.	Terveet vapaaehtoiset; T; 4, 8 ja 24 h	ELISA (supernatantti säilytetty -20 asteessa)	LPS (TLR4)	50, 100, 250, 500 ja 1000 pg/ml	Kokoveri, mediumina RPMI 1640	TNF- α , TNF-RI, TNF-RII, IL-6, IL-10
Pioli P et al. (2006): <u>Lipopolysaccharide-Induced IL-1β Production by Human Uterine Macrophages Up-Regulates Uterine Epithelial Cell Expression of Human β-Defensin.</u> LPS aiheuttaa voimakkaan IL-1 β :n tuotannon monosyyteissä (ja kohdun makrofageissa), jota suuret määrät estradiolia lisäävät vielä entisestään.	Gynekologiset potilaat; T; 24 h	TaqMan PCR; ELISA	LPS (TLR4) Pam ₃ Cys (TLR1 ja 2) PGN (TLR2) Poly(I:C) (TLR3) flagelliini (TLR5)	10 ng/ml 10 ng/ml 20 μ g/ml 1 μ g/ml 10 μ g/ml	PBMC-solut (\rightarrow monosyyttien eristys) ja makrofagit, viljely RPMI 1640-mediumissa, jossa 10 % FCS:ää ja 50 μ g/ml gentamysiiniä	IL-1 β

Roelofs M et al. (2005): <u>The Expression of Toll-like Receptors 3 and 7 in Rheumatoid Arthritis Synovium Is Increased and Costimulation of Toll-like Receptors 3, 4, and 7/8 Results in Synergistic Cytokine Production by Dendritic Cells</u> . RA-potilaiden DC:iden TLR2- ja 4-stimulointi aiheutti suuremman TNF- α - ja IL-6-vasteen kuin terveiden, TLR3-, 7- ja 8-stimulaatiossa eroa ei ollut. TLR3-4-7-8-yhteisstimulaatio aiheutti synergistisen sytokiinituotannon.	Nivelreumapotilaat + terveet vapaaehtoiset; T; 48 h	Bio-plex system	LTA (TLR2) LPS (TLR4) Extra Domain A protein (EDA) (TLR4) Poly(I:C) (TLR3) R848 (TLR7) Pam ₃ Cys (TLR2) Fibroblasteja stimuloiva lipopeptidi 1 (FSL-1) (TLR2)	10 μ g/ml 2 μ g/ml 1 μ mol/l ? ? ? ?	MDDC-solut. Monosyyttien viljely 6 vuorokauden ajan: RPMI 1640-medium, jossa 10% FCS:ää, antibioottia ja antimykoottia, IL-4:ää 500 U/ml, GM-CSF:ää 800 U/ml	TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12
Roponen M et al. (2009): <u>Toll-like receptor 7 function is reduced in adolescents with asthma</u> . Nuorilla astmaatikoiden TLR7-toiminta on heikentynyt: astmaatikoiden TLR7:n indusoiman IP-10:n pitoisuus oli huomattavasti alhaisempi ja IgE:n pitoisuus huomattavasti korkeampi kuin terveillä.	Nuoret terveet vapaaehtoiset, atooppikot ja atooppiset astmaatikot; J; 6 h	RT-PCR; fluorometria; ELISA	Poly(I:C) (TLR3) imikimodi (TLR7)	50 μ g/ml 1 μ g/ml	PBMC-solut, mediumina RPMI 1640, jossa 10% FCS:ää ja gentamysiiniä	IRF7; IL-6, IL-10; IP-10
Sarir H et al. (2009): <u>Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human macrophages</u> . Tupakansavu aiheuttaa TLR4-välitteisen IL-8-tuotannon makrofageissa sekä moduloi TLR4:n ekspressiota.	Terveet verenluovuttajat; T; 3 h	ELISA	LPS (TLR4) tupakansavu	100 ng/ml 0,03 ja 0,06 OD (OD 4 = 100%)	Monosyyteistä johdetut makrofagit. Monosyyttien viljely 5 vrk:n ajan mediumissa, jossa 2.5 ng/ml GM-CSF:ää ja 25 ng/ml M-CSF:ää	IL-8

Schaub B et al. (2006): Neonatal immune responses to TLR2 stimulation: Influence of maternal atopy on Foxp3 and IL-10 expression. Äidin atopia vaikuttaa heikentävästi lapsen IL-10-vasteisiin ja näin ollen myös myöhempään mikrobeille altistumisen aiheuttamiin vasteisiin.	Terveiden ja atooppisten äitien vastasyntyneet lapset (napanuoraverta); T; 72 h	ELISA; RT-PCR	Peptidoglykaani (TLR2) <i>Dermatophagoides farinae</i> (TLR2) PHA (TLR2)	10 µg/ml 30 µg/ml 5 µg/ml	CBMC-solut. Pesu RPMI 1640:llä, laimennos 10-prosenttiseen humaaniseerumiin (5x10 ⁶ solua/ml)	IL-10, IL-12, IL-13, IFN-γ, TNF-α; TGF-β
Schmitt A et al. (2008): Quantitative expression of Toll-like receptor-2, -4, and -9 in dendritic cells generated from blasts of patients with acute myeloid leukemia. Ei eroja AML-potilaiden ja terveiden välillä TLR-ekspressiossa eikä sytokiinivasteissa. LPS:n ja ODN:ien käyttö leukemiapotilaiden rokotteiden adjuvanttina voisi olla hyvä idea.	AML-potilaat ja terveet vapaaehtoiset; T; 24 h	ELISA (supernatantti säilytetty -20 asteessa)	PGN ja LTA (TLR2) LPS (TLR4) CpG ODN 2006 ja 2216 (TLR9)	10 µg/ml 10 µg/ml 10 µg/ml 5 µg/ml	DC- ja PBMC-solut. Viljely RPMI 1640 -mediumissa, jossa 10 % humaan-AB seerumia, 2 mM L-glutamiinia, 100 U/ml penisilliiniä ja 100 U/ml streptomysiiniä	TNF-α, IP-10, IL-6, IFN-α
van Duin D et al. (2007): Age-Associated Defect in Human TLR-1/2 Function. Yli 65-vuotiailla Pam ₃ CSK ₄ -stimuloitu TLR1/2-välitteinen TNF-α- ja IL-6-tuotanto oli merkittävästi heikompaa kuin 21 - 30-vuotiailla johtuen TLR1:n pienemmästä ekspressiosta yli 65-vuotiailla. Myös poly(U):lla stimuloitu TLR7/8-välitteinen IL-6-tuotanto oli heillä heikompaa.	Terveitä nuoria ja vanhempia aikuisia; J ja T; 18 h	Virtaussytometria; ELISA (supernatantti säilytetty -80 asteessa)	Pam ₃ CSK ₄ (TLR1 ja 2) LTA (TLR2 ja 6) LPS (TLR4) flagelliini (TLR5) Poly(U) (polyuridylaatti) (TLR7 ja 8)	10 µg/ml 2 µg/ml 1 µg/ml 5 µg/ml 0,5 µg/ml	PBMC-solut. Medium RPMI 1640	IL-8, TNF-α, IL-6
Van Eijk L et al. (2007): Gender differences in the innate immune response and vascular reactivity following the administration of endotoxin to human volunteers. Naisilla LPS:n indusoimien proinflammatoristen sytokiinien (lähinnä TNF-α) tuotanto runsaampaa kuin miehillä, naisilla myös enemmän LBP:tä.	Terveet vapaaehtoiset; (T); 15, 30, 60, 90, 120, 180 ja 240 min	Simultaneous Luminex Assay (supernatantti säilytetty -80 asteessa)	LPS (TLR4)	2 ng/kg	(in vivo -koe)	TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IFN-γ

<u>Yeganeh M et al. (2008): Toll-Like Receptor Stimulation Induces Higher TNF Secretion in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Hyper IgE Syndrome.</u> HIES-potilailla sytokiinivaste ei ole kontrolleja heikompi. Suuremmilla TLR-agonistiannoksilla TNF- α -vaste on jopa suurempi kuin kontrolleilla.	HIES-potilaita; T; 16 h	ELISA (supernatantti ollut jäädytettynä -80 asteessa)	PGN (TLR2) LPS (TLR4) <i>S. aureus</i> (TLR2)	3 μ g/ml 1 ja 10 ng/ml 10 ⁷ ja 10 ⁸ CFU/ml	PBMC-solut. Eristys sentrifugoimalla, mediumina RPMI 1640, jossa 10 % FBS:ää. Viljelytiheys 2x10 ⁶ solua/ml	TNF- α , IL-8
---	-------------------------	--	---	---	--	----------------------